

ESTUDO DO EFEITO DA APLICAÇÃO DE DIFERENTES COLAS COMERCIAIS NA COMPOSIÇÃO POLIFENÓLICA DE VINHOS DO PORTO

JOANA COUTINHO BRÁS

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em
Viticultura e Enologia

Orientadores: Doutora Joana Oliveira

Professor Doutor Victor de Freitas

Júri:

Presidente: Doutor Jorge Bernardo Lacerda de Queiroz, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

Vogais: Professor Doutor João Manuel Pissarra Soeiro de Carvalho, Professor Auxiliar Convidado da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro;

Doutora Joana Alexandra Silva Oliveira Pinto da Silva, Investigadora Auxiliar da REQUIMTE – Laboratório Associado para a Química Verde.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a oportunidade de ter a Doutora Joana Oliveira como orientadora desta dissertação e por todo o apoio que me concedeu desde o momento que mostrei interesse em realizar o trabalho na Faculdade de Ciências.

Ao Professor Doutor Victor Freitas e ao Professor Doutor Nuno Mateus, por acreditarem numa aluna vinda de outra instituição e me darem a oportunidade de trabalhar juntamente com o seu grupo de investigação.

A todos os colegas do laboratório que se tornaram na minha família do Porto, em especial à Ana Luísa, à Iva, à Joana Azevedo, à Rosa, à Sílvia, ao Luís, à Susana, à Elsa, à Natércia, à Ana Évora, à Mafalda, ao Ricardo, ao Helder e ao Nacho, por todos os momentos de apoio, amizade e todas as brincadeiras.

Às minhas amigas Paula Araújo, Ana Gomes e Rita Mourão por me fazerem sentir em casa nesta minha nova aventura no Porto. Sem vocês, não tinha conseguido. Especial agradecimento à Paulinha por ter sido muito mais que uma amiga, uma segunda orientadora em todo o meu trabalho de mestrado.

Ao Pedro Pereira, que me fez acreditar e a nunca desistir dos meus sonhos. Contigo nada é impossível.

Em especial aos meus Pais e à minha Irmã, mas também a toda a minha família, por todo carinho e incentivo em todos os momentos da minha vida e por me darem sempre força para voar mais alto.

À Instituto Superior de Agronomia de Lisboa e à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, por todos os ensinamentos que me transmitiram.

À empresa Gran Cruz, Sociedade Comercial de Vinhos, Lda., por me cederem todas as amostras de Vinho do Porto e pela disponibilidade prestada ao longo do trabalho.

Objetivos do trabalho

Este trabalho teve como principal objetivo compreender o efeito da utilização de diferentes colas comerciais no processo de estabilização de duas categorias de Vinho do Porto, Tawny e Ruby.

Para isso será necessário realizar a caracterização das colas comerciais escolhidas para assim se observar a sua ação preferencial.

Com base na caracterização dos principais compostos fenólicos presentes nos dois vinhos, pretendeu-se identificar qual a cola mais adequada à sua produção e em que compostos atuam preferencialmente.

Com este estudo pretende-se otimizar a operação de colagem ao escolher o tipo de cola mais adequado ao produto final.

Resumo

A preocupação por parte das empresas de produção de vinhos concentra-se cada vez mais na estabilização da cor ao longo do tempo através de processos naturais que afetem o mínimo possível o produto final. Dessa forma, o efeito das colas proteicas escolhidas na estabilização dos diferentes vinhos foi determinado pela sua ação sob os diferentes compostos fenólicos.

Para isso procedeu-se à caracterização das proteínas das colas utilizadas na clarificação de vinhos por eletroforese separando-as pelos seus pesos moleculares. Este parâmetro é importante para avaliar a eficiência das colas. Verificou-se que são constituídas por proteínas de baixo peso molecular (< 14 kDa) de forma a estabilizar a cor mas tendo efeitos mínimos sobre o vinho.

Foram realizados testes de colagem para cada um dos vinhos em comparação a um controlo não tratado, sendo avaliados vários parâmetros, nomeadamente intensidade corante, taninos proantociânicos totais, antocianinas livres totais, índice de diálise, poder tanante, índice de Folin-Ciocalteu e a avaliação das propriedades antioxidantes (DPPH e FRAP).

Pela análise estatística e comparação dos efeitos nas duas amostras de vinho podemos concluir que a ação das colas é inteiramente afetada pela sua composição polifenólica sendo a eliminação de compostos mais evidente no Tawny.

Palavras-chave: Vinho do Porto, estabilização, gelatina líquida, proteínas, compostos fenólicos.

Abstract

Nowadays the main concern of winemaking companies is focused on the colour stabilization using natural processes that affects the final product in a lesser extent. For this reason, the effect of different commercial fining agents on the phenolic composition of two different Port wines (Tawny and Ruby) was determined.

For that, the protein characterization of all the gelatines used as fining agents was determined by SDS-PAGE and it was possible to obtain the protein distribution according to their molecular weight (MW). This parameter is important for the evaluation of fining agent efficiency. In the gelatines tested were observed bands representative of low molecular weight proteins (<14 kDa) that are known to stabilize the colour matter but with minimum effect on the wine characteristics.

The assessment of different parameters such as colour intensity, total proanthocyanic tannins, free anthocyanins, dialysis index, tanning power and antioxidant activity (DPPH and FRAP) were performed in both types of Port wines (Tawny and Ruby) that were finned with different commercial gelatines in comparison with a sample before the finning process.

According to statistical analysis, the effect of the different fining agents is highly depended on the wine phenolic composition being more marked in the Tawny than in the Ruby.

Keywords: Port Wine; stabilization; liquid gelatine; protein; phenolic compounds.

Índice

AGRADECIMENTOS.....	I
OBJETIVOS DO TRABALHO.....	II
RESUMO.....	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE QUADROS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
INTRODUÇÃO.....	1
1. COMPOSTOS NÃO-FLAVONÓIDES	2
1.1 Ácidos Fenólicos.....	2
1.2 Estilbenos	3
2. COMPOSTOS FLAVONÓIDES.....	4
2.1 Flavan-3-óis.....	5
2.1.1 Propriedades dos taninos.....	9
2.2 Antocianinas	10
2.2.1 Formas de equilíbrio das antocianinas.....	11
2.2.2 Copigmentação	13
2.2.3 Reação das antocianinas com o bissulfito	14
3. VINHO DO PORTO	15
4. COLAGEM.....	16
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	19
2. CARATERIZAÇÃO DAS COLAS	20
2.1 Separação de proteínas por SDS-PAGE em sistema Tris-Glicina	20
2.2 Separação de proteínas SDS-PAGE em sistema Tris-Tricina	20

3.	ESTUDO DA COMPOSIÇÃO POLIFENÓLICA DOS VINHOS	21
3.1	Análise da Cor.....	21
3.1.1	Intensidade Corante	21
3.1.2	CIELab	21
3.1.3	Análise das antocianinas	22
3.1.3.1	Antocianinas livres totais	22
3.1.3.2	Quantificação de antocianinas por HPLC	23
3.1.4	Índice de fenóis totais	25
3.1.5	Taninos proantociânicos totais	25
3.1.6	Índice de Diálise.....	26
3.1.7	Poder Tanante.....	27
3.1.8	Análise dos Flavan-3-óis	27
3.1.8.1	Extração líquido-líquido	27
3.1.8.2	Fracionamento de Catequinas e Procianidinas diméricas e triméricas por cromatografia líquida em coluna de gel TSK Toyopearl HW-40(S).....	28
3.1.8.3	Análise dos flavonóis por HPLC	28
3.1.9	Doseamento de fenóis totais – Índice de Folin-Ciocalteu.....	30
3.1.10	Propriedades antioxidantes.....	30
3.1.10.1	Capacidade antiradicalar – DPPH	30
3.1.10.2	Avaliação do poder redutor – FRAP	31
4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
1.	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA.....	33
2.	ANÁLISE VISUAL DO TESTE DE COLAGEM	33
3.	CARATERIZAÇÃO DAS COLAS	34
4.	ANÁLISE DA COR	36
4.1	Intensidade Corante.....	36
4.2	Cielab	38
4.3	Análise das antocianinas.....	41
4.3.1	Antocianinas Livres Totais.....	41
4.3.2	Quantificação de antocianinas por HPLC	42

4.4	Índice de Fenóis Totais.....	45
4.5	Taninos proantociânicos totais	46
4.6	Índice de Diálise	47
4.7	Poder Tanante	48
4.8	Análise dos flavan-3-óis	49
4.9	Índice de Folin-Ciocalteu	52
4.10	Análise das propriedades antioxidantes	52
4.10.1	Capacidade antiradicalar (DPPH)	53
4.10.2	Avaliação do poder redutor - FRAP	53
CONCLUSÕES.....		55
BIBLIOGRAFIA.....		56
ANEXOS		66

Índice de Figuras

Figura 1 - Estruturas gerais dos ácidos benzóicos e cinâmicos	2
Figura 2 – Estrutura geral dos fenóis voláteis formados no vinho a partir de ácidos fenólicos	3
Figura 3 - Estrutura geral dos estilbenos.....	4
Figura 4 - Estrutura do núcleo flavânico.....	4
Figura 5 - Estrutura geral das diferentes classes de compostos flavonóides	5
Figura 6 - Estruturas das unidades monoméricas dos flava-3-nóis	6
Figura 7 - Decomposição de proantocianidinas por aquecimento em meio ácido (Bate-Smith, 1954a)	6
Figura 8 - Estrutura das procianidinas diméricas do tipo B.....	7
Figura 9 - Estrutura das procianidinas diméricas do tipo A2.....	8
Figura 10 - Estrutura das procianidinas triméricas do tipo C1	8
Figura 11 - Esquema geral das proantocianidinas polimerizadas	9
Figura 12 - Estrutura geral das principais antocianinas na espécie <i>Vitis vinifera</i>	10
Figura 13 - Estrutura de antocianinas monoglucosídicas e respetivos ésteres acilados	11
Figura 14 - Formas de equilíbrio das antocianinas em solução pelo efeito do pH.....	12
Figura 15 - Reação reversível do bissulfito com as antocianinas	14
Figura 16 - Categorias de vinho do Porto (IVDP, 2004)	15
Figura 17 - Mecanismo de floculação de proteínas durante a colagem (Ribéreau-Gayon et al., 1977)	18
Figura 18 - Círculo Cromático	22
Figura 19 - Cromatograma de HPLC do perfil de antocianinas num vinho jovem.....	24
Figura 20 - Cromatograma de HPLC da fração 1 de um vinho.....	29
Figura 21 - Cromatograma de HPLC da fração 2 de um vinho.....	29
Figura 22 - SDS-PAGE Tris-Glicina das diferentes colas usando ASB com padrão interno	34
Figura 23 - SDS-PAGE Tris-Tricina das diferentes colas usando ASB com padrão interno	35
Figura 24 - Histograma de comparação da intensidade corante ($P < 0,05$).....	36
Figura 25 - Intensidade corante do vinho Tawny.....	37
Figura 26 - Intensidade Corante do vinho Ruby	37
Figura 27 - Gráfico correspondente aos parâmetros a^* e b^* do vinho Tawny.....	40
Figura 28 - Gráfico correspondente aos parâmetros a^* e b^* do vinho Ruby	40
Figura 29 - Histograma representativo das antocianinas livre totais ($P < 0,05$)	41

Figura 30 - Cromatograma do perfil das antocianinas do vinho Tawny.	43
Figura 31 - Cromatograma do perfil das antocianinas do vinho Ruby.	43
Figura 32 - Histograma das antocianinas monoméricas ($P < 0,05$)	45
Figura 33 - Histograma do índice de fenóis totais ($P < 0,05$).....	46
Figura 34 - Histograma dos valores médios de taninos proantociânicos totais (g.L^{-1}) ($P < 0,05$).....	47
Figura 35 - Histograma dos valores médios do índice de diálise ($P < 0,05$)	48
Figura 36 - Histograma de comparação dos valores médios do poder tanante (NTU.mL^{-1} vinho) ($P < 0,05$).....	49
Figura 37 - Cromatograma de HPLC da 1ª fração do vinho Tawny (Controlo e Cola 4)	50
Figura 38 - Cromatograma de HPLC da 1ª fração do vinho Ruby (Controlo e Cola 4)	51
Figura 39 - Histograma de quantificação de procianidinas ($P < 0,05$)	51
Figura 40 - Histograma do índice de Folin-Ciocalteu ($P < 0,05$)	52
Figura 41 - Histograma da capacidade antiradicalar ($P < 0,05$)	53
Figura 42 - Histograma do poder redutor ($P < 0,05$).....	54

Índice de Quadros

Quadro 1 - Doses aplicadas em cada ensaio.....	19
Quadro 2 - Gradiente de eluição utilizado na análise das antocianinas totais	23
Quadro 3 - Gradiente de eluição na análise das catequinas e procianidinas oligoméricas	28
Quadro 4 - Análise química inicial das duas amostras de Vinho do Porto.....	33
Quadro 5 - Percentagem de borra formada.	33
Quadro 6 - Caraterísticas cromáticas dos dois vinhos do Porto em contacto com as diferentes colas comerciais.....	38

Lista de abreviaturas

a* – Coordenada colorimétrica (Verde - Vermelho)

Abs – Absorvância

ASB – Albumina sérica bovina

b* – Coordenada colorimétrica (Amarelo - Azul)

D – Valor da absorvância da amostra dialisada

D0 – valor da absorvância da referência

DAD – Detetor de barra de díodos (Diode array detector)

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*)

FRAP – Capacidade de reduzir o ferro (*Ferric reducing ability power*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (High performace liquid chromatography)

IC – Intensidade corante

I.D – Índice de diálise

IFT – Índice de fenóis totais

L* – Luminosidade

MeOH – Metanol

MW – Molecular Weight (Peso molecular)

MWCO – Molecular weight cut-off

NTU - Unidades de turbidez (*Nephelometric Turbidity Units*)

SDS-PAGE – Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel eletrophoresis

SMV – Solução modelo de vinho

TPA – Taninos proantociânicos totais

UV-Vis – Ultra-violeta/ Visível

$\lambda_{\text{máx}}$ – Comprimento de onda do máximo de absorção

ΔC – Diferença da Cromaticidade entre duas amostras

ΔH – Diferença da Tonalidade entre duas amostras

ΔE – Diferença da percepção cromática entre duas amostras

Introdução

O vinho é uma matriz muito complexa devido à grande variedade de compostos presentes nas uvas e aumenta essa complexidade durante o processo de fermentação, estabilização e armazenamento.

Mais de 500 compostos diferentes foram identificados em diferentes categorias de vinho. Estes incluem água (74–87%), etanol (10–14%), açúcares (0,05–10%), ácidos orgânicos (0,05–0,7%), fenóis (0,01–0,2%), e glicerol (Soleas *et al.*, 1997).

Particularmente o grupo dos compostos fenólicos que resulta do metabolismo secundário das plantas (Beart *et al.*, 1985), é produzido por estas como forma a se protegerem contra agentes agressores (bactérias, fungos, insetos e herbívoros) e intervêm no crescimento celular.

Nos vinhos, os compostos fenólicos são responsáveis por diversas características organoléticas, nomeadamente a cor, o sabor, a adstringência e consequentemente a capacidade de envelhecimento (Arnold *et al.*, 1980; Haslam, 1980). Estes compostos são extraídos das uvas para o vinho através de diversos processos enológicos e através das transformações sofridas ao longo do processo de envelhecimento levam à formação de novos compostos mais estáveis que modificam as suas características iniciais (Jurd, 1969; Somers, 1971; Rivas-Gonzalo *et al.*, 1995; Pissarra *et al.*, 2003).

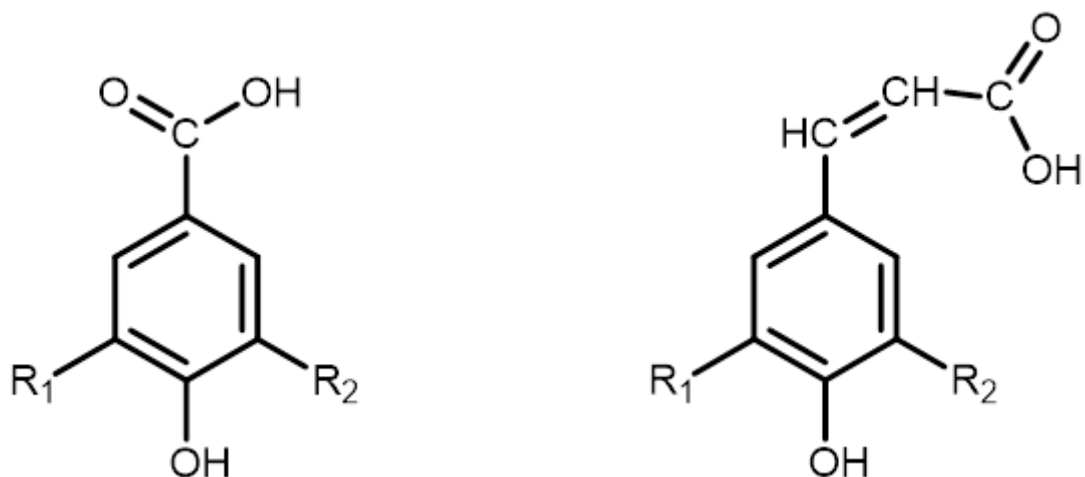
Para além do seu papel importante em enologia, estes compostos apresentam propriedades benéficas para a saúde, como demonstrado em diversos estudos, que quando ingerido em moderação protege os consumidores de doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias, viroses, mutações e cancro (Laranjinha and Cadenas, 1999; Santos-Buelga and Scalbert, 2000; Fernandes *et al.*, 2010).

As duas classes de compostos fenólicos conhecidas são: os não-flavonóides, (ácidos fenólicos, estilbenos e álcoois fenólicos) e os flavonóides (flavan-3-óis, flavonóis, flavanonas, flavonas, isoflavonas, chalconas e antocianinas).

1. Compostos não-flavonóides

1.1 Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos dividem-se em 2 grupos: os **ácidos benzóicos** (estrutura em $C_6 - C_1$) e os **ácidos cinâmicos** (estrutura em $C_6 - C_3$) onde as suas concentrações nos vinhos tintos são de 100-200 mg/l e nos vinhos brancos de 10-20 mg/l. Os vários ácidos são diferenciados pela substituição no anel benzénico (Figura 1).



Ácido benzoico	R_1	R_2
<i>p</i> -hidroxibenzoico	H	H
Protocatechuico	OH	H
Vanílico	OCH_3	H
Gálico	OH	OH
Siríngico	OCH_3	OCH_3

Ácido cinâmico	R_1	R_2
<i>p</i> -cumárico	H	H
Cafeico	OH	H
Ferúlico	OCH_3	H
Sinápico	OCH_3	OCH_3

Figura 1 - Estruturas gerais dos ácidos benzóicos e cinâmicos

Os ácidos fenólicos aparecem quase sempre esterificados com outros compostos, nomeadamente, podem ocorrer sob a forma de ésteres do ácido tartárico, ou na forma glucosilada (Clifford, 1999).

Os derivados dos ácidos cinâmicos estão envolvidos nos fenómenos de oxidação enzimática e acastanhamento dos vinhos brancos (Singleton, 1987) sendo os ácidos fenólicos que existem em maior quantidade nas uvas (Ribéreau-Gayon, 1965).

Devido à oxidação dos fenóis, observa-se uma mudança de cor para castanho por exemplo em batatas, bananas e maçãs, chamado o acastanhamento enzimático. A exposição ao ar dos tecidos afetados produz um rápido escurecimento, devido à

oxidação enzimática dos fenóis em *o*-quinonas, que por sua vez polimerizam rapidamente para formar substâncias poliméricas de cor castanha, as melaninas.

Por ação da enzima polifenoloxidase, os monofenóis são hidroxilados a *o*-difenois que por sua vez são oxidados a *o*-quinonas e quando polimerizados, dão origem às melaninas.

Do ponto de vista organolético, os ácidos fenólicos não têm particular interesse em termos de aroma e de sabor; no entanto, sob a ação de leveduras de contaminação como a *Brettanomyces*, podem dar origem ao aparecimento de fenóis voláteis, responsáveis por aromas desagradáveis, como o 4-etil-fenol, caracterizados por terem um “odor a animal” (Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2006) (Figura 2).

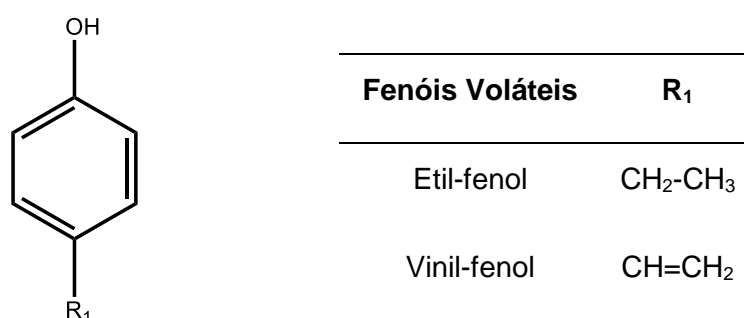


Figura 2 – Estrutura geral dos fenóis voláteis formados no vinho a partir de ácidos fenólicos

1.2 Estilbenos

Os estilbenos são caracterizados pela existência de dois anéis benzênicos ligados por uma cadeia de etileno (Figura 3). Quase todos os estilbenos possuem duas formas isoméricas, sendo a forma *trans* a mais estável.

As películas das uvas contêm um estilbeno extremamente importante, o resveratrol. Esta substância antioxidante concentra-se nas células da película da uva, sendo por isso o seu teor mais elevado em vinhos tintos do que em vinhos brancos.

O resveratrol, pertencente ao grupo de compostos de baixo peso molecular, é produzido pelas videiras e sintetizado num largo número de plantas como resposta a agressões/ infeções por agentes patogénicos (bactérias, vírus, fungos e insetos) e na defesa de situações de stress (Langcake and Pryce, 1977; Hart, 1981; Jeandet *et al.*, 1991; Korhammer *et al.*, 1995). Em termos biológicos, este composto, é também responsável pela redução da viscosidade do sangue, diminuição dos níveis de lípidos no soro sanguíneo e a agregação plaquetária, aumentando a fração de colesterol HDL (colesterol “bom”), que ajuda a remover o colesterol LDL (colesterol “mau”),

prevenindo assim a obstrução das artérias e como consequência o desenvolvimento da aterosclerose.

Em Viticultura, o resveratrol, é um composto importante por se tratar de um precursor de moléculas, que possuem propriedades antifúngicas (viniferinas), e que conferem resistência à colonização dos bagos da uva pelo fungo *Botrytis cinerea*, responsável pela podridão cinzenta.

As concentrações deste composto encontram-se entre 1 e 3 mg/L.

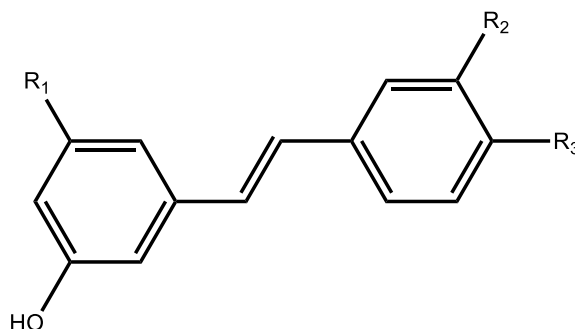


Figura 3 - Estrutura geral dos estilbenos

2. Compostos Flavonóides

Estruturalmente, os flavonóides são constituídos por 15 átomos de carbono (C₆-C₃-C₆) no seu esqueleto básico apresentando uma estrutura em que dois anéis aromáticos (A e B) são ligados por um anel heterocíclico pirânico (C) (Zoecklein, 1995) (Figura 4).

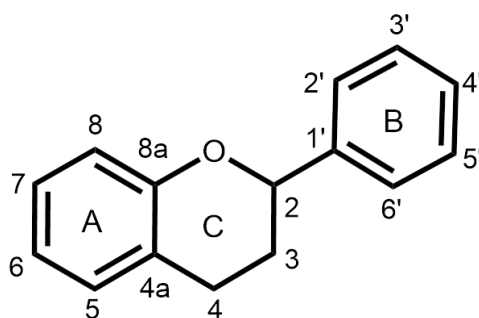


Figura 4 - Estrutura do núcleo flavânico

Dentro da classe dos flavonóides, temos os flavanóis, os flavonóis, os flavanonóis, as flavonas, as flavanonas e as antocianidinas (Figura 5).

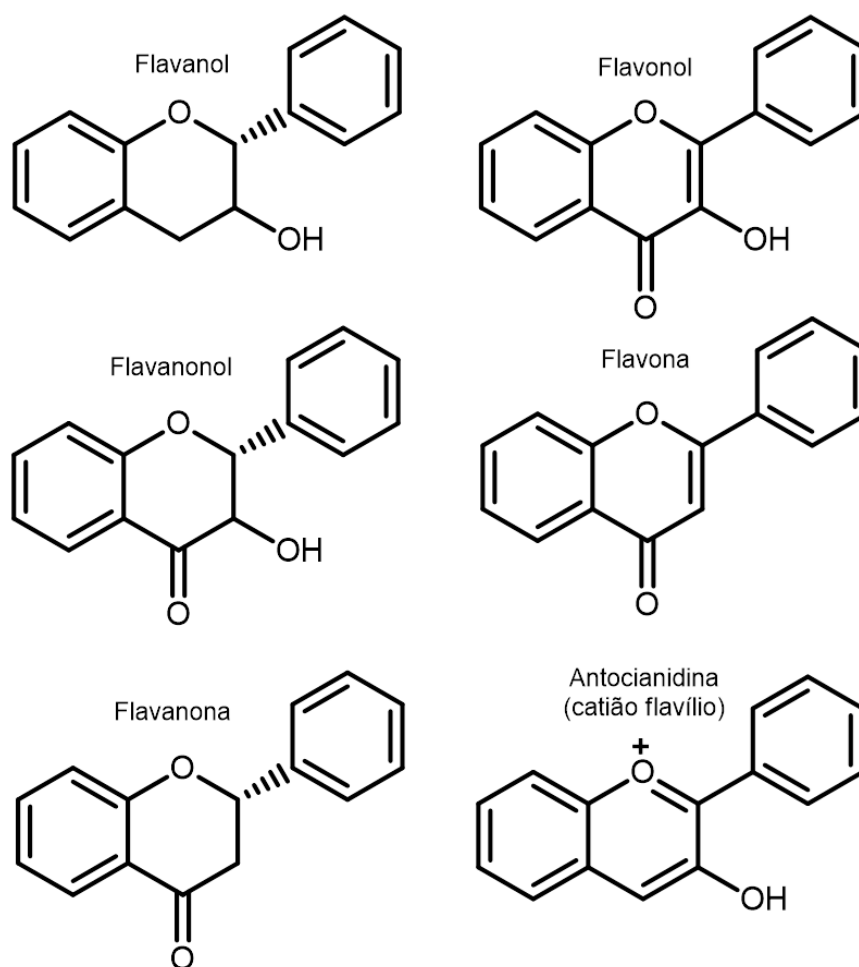


Figura 5 - Estrutura geral das diferentes classes de compostos flavonóides

2.1 Flavan-3-óis

Os flavan-3-óis, são os responsáveis pelas sensações gustativas no vinho e apresentam um papel importante no envelhecimento dos mesmos.

Em termos estruturais, são constituídos por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel heterocíclico pirânico C que caracterizam o núcleo flavânico, ao qual se encontra ligado na posição 3 do anel heterocíclico um grupo hidroxilo.

Estes compostos, existem sob diversas formas na Natureza, mas na espécie *Vitis vinifera*, os flavan-3-óis encontram-se hidroxilados nas posições 5 e 7 do anel A, variando apenas no número de grupos hidroxilo no anel B e na estereoquímica do carbono 3 do anel C, podendo ser diferenciados em catequinas quando hidroxilados nas posições 3' e 4' do anel B ((+)-catequina e (-)-epicatequina) e galhocatequinas quando hidroxilados nas posições 3', 4' e 5' do anel B ((+)-galhocatequinas e (-)-epigalhocatequinas) (Figura 6).

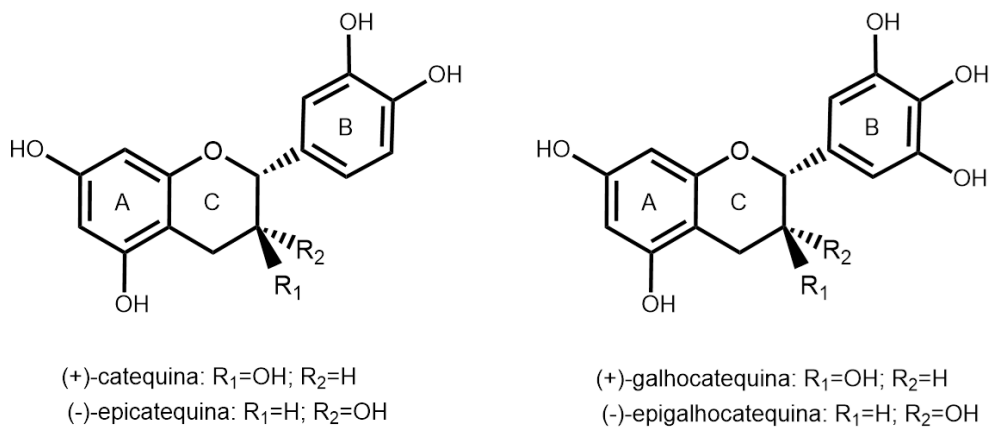


Figura 6 - Estruturas das unidades monoméricas dos flava-3-nóis

Podem ainda na posição O-3 do anel pirânico C, encontrar-se esterificados com o ácido gálico ou com uma glucose (Piretti *et al.*, 1976; Lee and Jaworski, 1990), ainda que a forma glicosilada não seja muito comum no reino vegetal (Porter, 1988).

Da condensação de unidades de flavan-3-óis, temos as proantocianidinas ou os taninos condensados que, consoante o número de vezes que esta unidade se repete podem ser diméricas, triméricas, oligoméricas (até 6 unidades) ou poliméricas (superior a 6 unidades).

As proantocianidinas são compostos que pela ação do calor e em meio ácido, decompõem-se em antocianidinas (cianidina e delphinidina) pela quebra das ligações interflavanólicas como o descrito na literatura por Bate-Smith, 1954a (Figura 7).

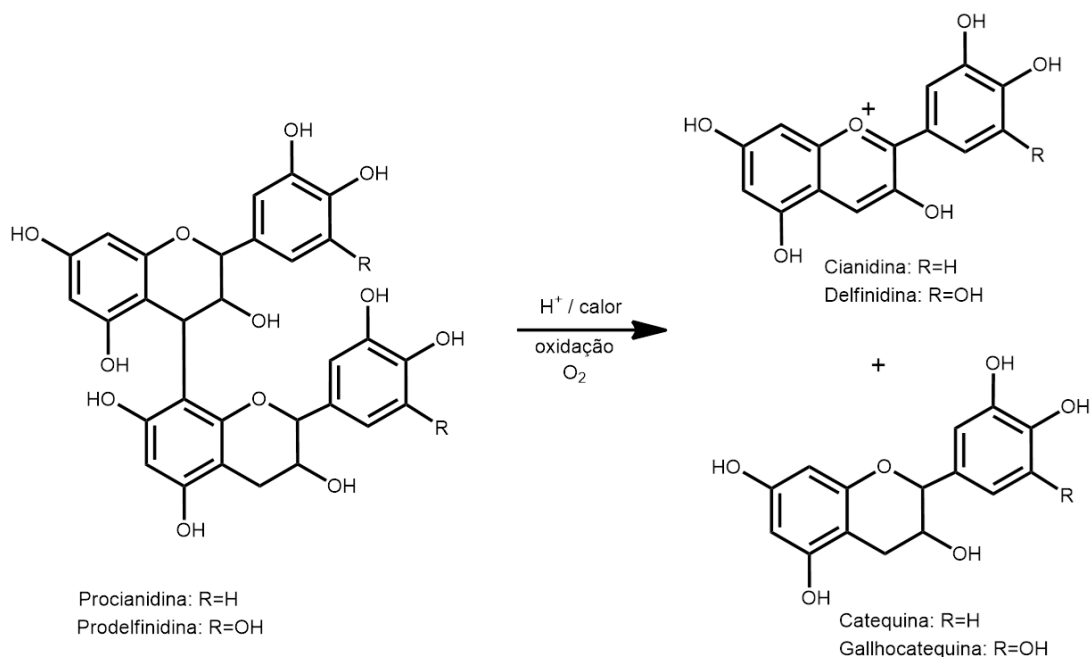


Figura 7 - Decomposição de proantocianidinas por aquecimento em meio ácido (Bate-Smith, 1954a)

Tendo em conta a natureza da unidade fundamental, as proantocianidinas podem dividir-se em dois grupos: as procianidinas (polímeros de catequina e epicatequina) e as prodelfinidinas (polímeros de galhocatequinas e epigalhocatequinas). Estruturalmente, estes compostos diferem entre si, pelo tipo de ligação interflavanólica, pelo grau de polimerização e pelo grau de esterificação com o ácido gálico. O tipo de ligação estabelecida entre as unidades monoméricas, designa-se por uma letra (A, B, C e D) e por um algarismo, de forma a identificar cada isómero dentro de cada grupo (Weinges *et al.*, 1968; Thompson *et al.*, 1972). Desta forma, as procianidinas diméricas do tipo B resultam da condensação de duas unidades flavanólicas, através de uma ligação entre o carbono 4 do monómero superior com o carbono 6 ou 8 da unidade inferior, como se pode ver na Figura 8.

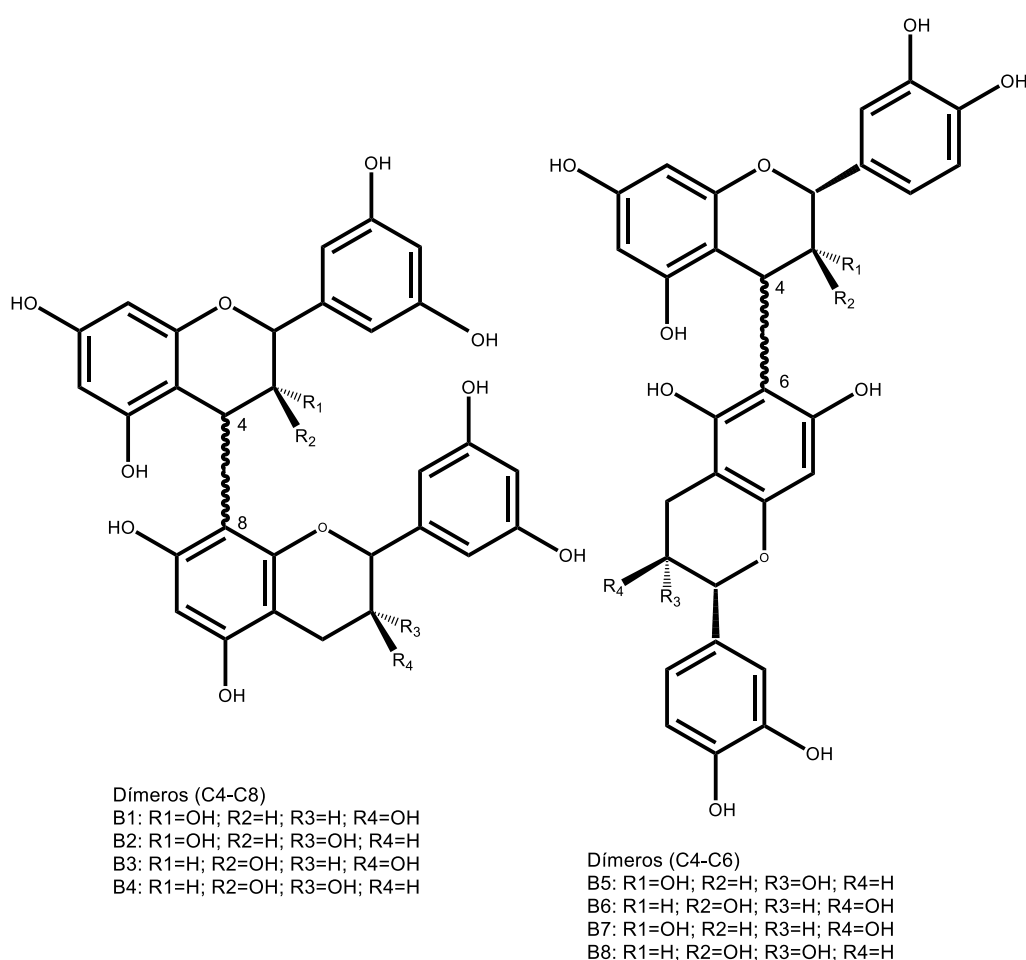


Figura 8 - Estrutura das procianidinas diméricas do tipo B

As procianidinas diméricas do tipo A apresentam uma ligação interflavanólica do tipo B e ainda uma ligação éter entre o carbono 2 do monómero superior e o grupo hidroxilo do carbono 5 ou 7 da unidade inferior (Salagoity-Auguste and Bertrand, 1984) (Figura 9).

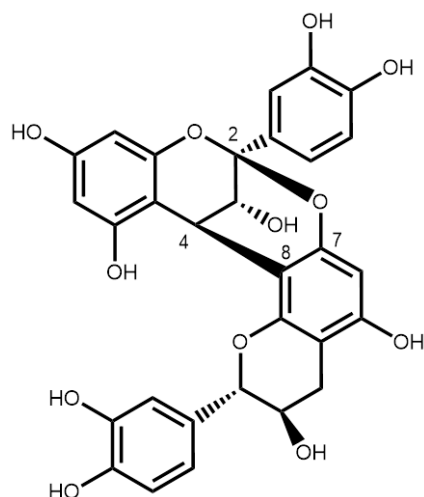


Figura 9 - Estrutura das procianidinas diméricas do tipo A2

As procianidinas triméricas podem ser divididas em dois grupos: as procianidinas triméricas do tipo C, em que as ligações interflavanólicas são do tipo B (Figura 10) e as procianidinas triméricas do tipo D, em que as ligações interflavanólicas são do tipo B e do tipo A.

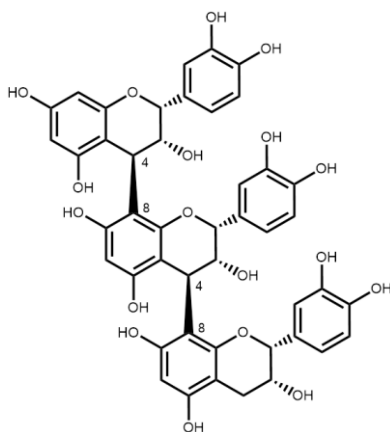


Figura 10 - Estrutura das procianidinas triméricas do tipo C1

As proantocianidinas mais abundantes na Natureza são, as procianidinas polimerizadas formando complexos moleculares de maiores dimensões (Figura 11): oligômeros até seis unidades monoméricas de flavan-3-óis e polímeros com mais de seis unidades monoméricas (Haslam, 2005).

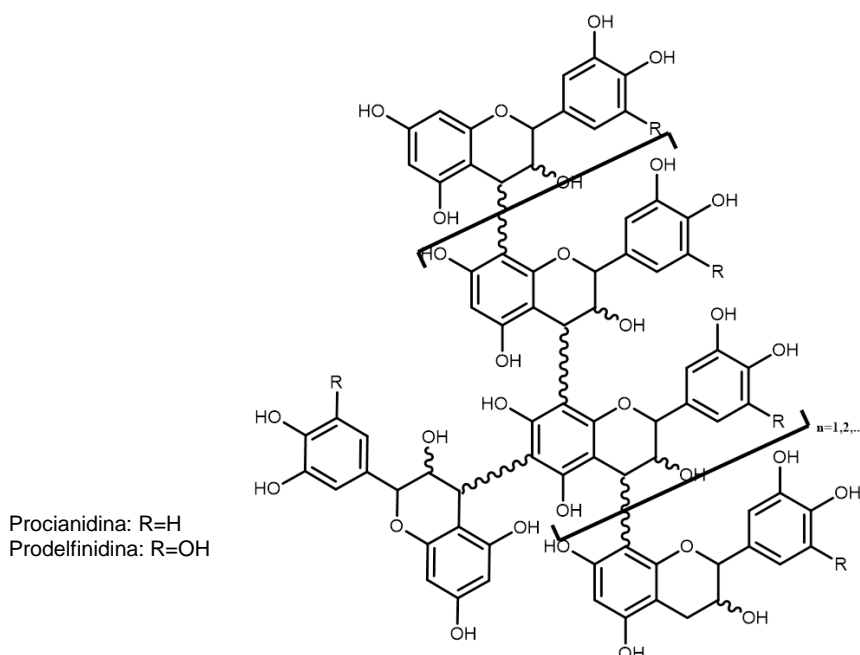


Figura 11 - Esquema geral das proantocianidinas polimerizadas

As principais proantocianidinas presentes nas uvas e nos vinhos são procianidinas, ou seja oligómeros e polímeros de catequina e epicatequina unidas por ligações C4-C8 e em menor quantidade por ligações C4-C6 (Ricardo da Silva, 1995).

Os teores em proantocianidinas dependem de inúmeros fatores, mas a sua distribuição relativa nas várias partes do cacho de uva mantém-se semelhante sendo que apresenta maiores concentrações nas grainhas. Na generalidade dos trabalhos apresentados revelam a procianidina B2 como sendo a forma dimérica mais abundante nas grainhas (Bourzeix *et al.*, 1986; Dumon *et al.*, 1991; Ricardo-Da-Silva *et al.*, 1992a; De Freitas, 1995; Ricardo da Silva, 1995; Fuleki and Ricardo-da-Silva, 1997; de Freitas *et al.*, 1998).

2.1.1 Propriedades dos taninos

Os taninos são divididos em dois grandes grupos: os taninos condensados (proantocianidinas) e os taninos hidrolisáveis.

Os taninos condensados apresentam um importante papel nas propriedades gustativas dos vinhos, por interagirem com as proteínas salivares, formando complexos estáveis que provocam a secura da boca, à qual se denomina por adstringência (Bate-Smith, 1973; Haslam and Lilley, 1988; Allen, 1994). Estes compostos podem ainda atuar ao nível da estabilização da cor, por fenómenos de copigmentação, ao ligarem-se às antocianinas durante a maturação e envelhecimento

dos vinhos (Michaud *et al.*, 1971; Czochanska *et al.*, 1979; Lee and Jaworski, 1989; Prieur *et al.*, 1994; De Freitas, 1995; Dallas *et al.*, 1996; Moutounet *et al.*, 1996).

Os taninos hidrolisáveis são constituídos por uma molécula de açúcar ligada a um composto fenólico, principalmente o ácido gálico (taninos gálicos) ou o ácido elágico (taninos elágicos) (Barquette and Trione, 1998). A origem destes compostos é exógena, passando para os vinhos pelo seu contato com a madeira durante o seu estágio em barrica. Esta é uma prática muito comum usada em vinhos com capacidade de envelhecimento superior à de vinhos sem estágio, uma vez que são facilmente diluídos em meio alcoólico.

Verificam-se diferenças nas propriedades gustativas entre vinhos jovens e vinhos envelhecidos, uma vez que o grau de polimerização dos taninos aumenta com a idade, reagindo menos com as proteínas da saliva, tal como a precipitação dos taninos ao longo dos anos.

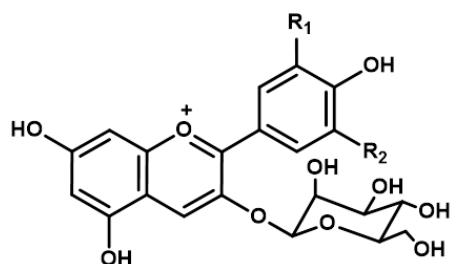
2.2 Antocianinas

As antocianinas são pigmentos naturais responsáveis por uma vasta gama de cores em vegetais, frutas e outros produtos derivados (Heredia *et al.*, 1998). Estas são também responsáveis pela coloração dos vinhos tintos e das uvas, estando localizadas na película e na polpa das castas tintureiras (Ribéreau-Gayon, 1964).

Do ponto de vista estrutural, são moléculas que se caracterizam pelo catião flavílio, polihidroxilados e/ou metoxilados nos anéis A e B.

As antocianinas podem ainda diferir entre si pelo número, natureza e posição dos açúcares ligados à molécula; e pelo número e natureza das cadeias alifáticas ou aromáticas esterificadas na molécula de açúcar (Guerra, 1997).

São relativamente instáveis em soluções aquosas e muito menos solúveis que as antocianinas (Timberlake and Bridle, 1966), por isso a glicosilação confere uma maior estabilidade e solubilidade a estes pigmentos (Figura 12).



Antocianidina	R ₁	R ₂
Delfinidina	OH	OH
Cianidina	OH	H
Petunidina	OCH ₃	OH
Peonidina	OCH ₃	H
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Figura 12 - Estrutura geral das principais antocianinas na espécie *Vitis vinifera*

Na espécie *Vitis vinifera* a glucosilação ocorre na posição O-3 (Timberlake and Bridle, 1966), e os fragmentos glucosídicos podem apresentar-se livres ou esterificados na posição 6 com alguns ácidos, nomeadamente o ácido acético, o ácido *p*-cumárico e o ácido cafeico. Na Figura 13 podemos ver a esterificação da glucose com alguns ácidos.

A quantidade de monoglucósidos acilados varia muito de casta para casta, contribuindo para a classificação das mesmas ao nível de perfil antociânico provocando geralmente um deslocamento batocrómico do máximo de absorção no visível, modificando assim a cor das antocianinas originais.

A acilação também provoca um aumento da resistência das antocianinas a degradação causada por fatores como a luz e a temperatura.

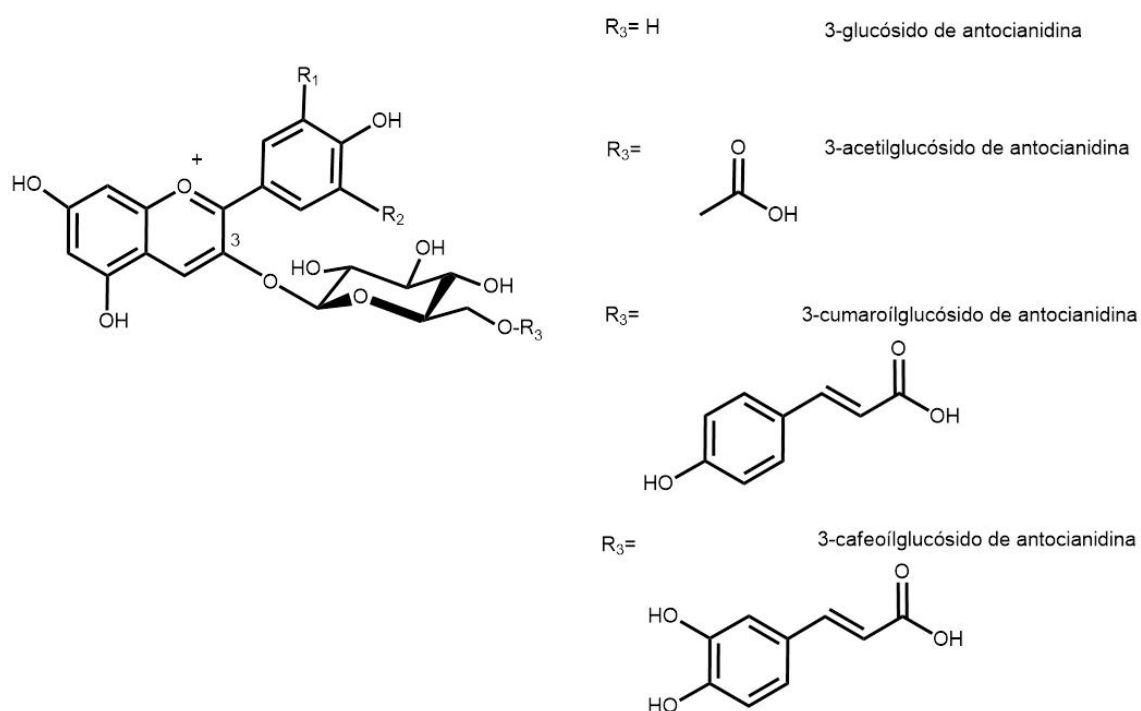


Figura 13 - Estrutura de antocianinas monoglucosídicas e respetivos ésteres acilados

Em espécies não *Vitis vinifera*, as moléculas de açúcar encontram-se ligadas nas posições O-3 e O-5, sob a forma de 3,5-diglucósidos (Ribéreau-Gayon, 1982).

2.2.1 Formas de equilíbrio das antocianinas

As antocianinas apresentam-se sobre diferentes formas em equilíbrio que dependem do pH do meio (Brouillard and Lang, 1990). A pH inferior a 1, as antocianinas encontram-se maioritariamente na forma de catião flavílio (AH⁺) e apresentam cor vermelha. Com o aumento do pH (pH~2), o catião flavílio sofre ataque nucleófilo por parte da água, formando-se a base carbinol incolor (B) em equilíbrio com

a forma de chalcona de cor amarela (C). A proporção de catião flavílio diminui bruscamente, traduzindo-se numa diminuição importante da cor vermelha. A pH entre 3 e 4, existe predominantemente a forma de base carbinol (B). A pH neutro ou alcalino ocorre uma desprotonação rápida do catião flavílio originando a base quinonoidal violeta (A) (Figura 14).

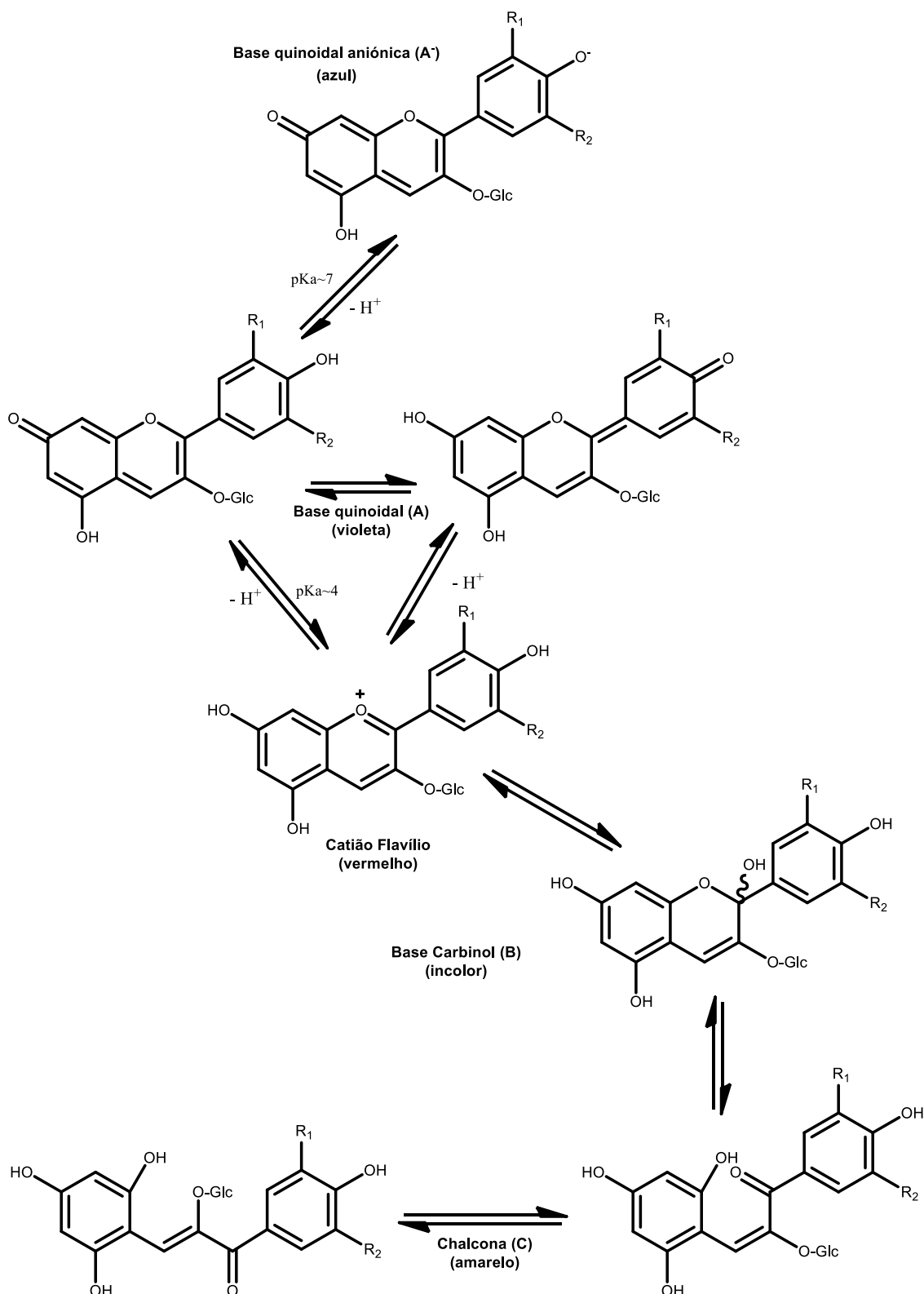


Figura 14 - Formas de equilíbrio das antocianinas em solução pelo efeito do pH

O pH dos vinhos varia normalmente entre 3,5 e 4,0, estando desta forma as antocianinas na forma de hemiacetal incolor (Brouillard and Lang, 1990). A predominância da cor vermelha no vinho deve-se à estabilização da forma de catião flavílio através de diferentes mecanismos como a copigmentação, auto-associação de antocianinas e/ ou formação de outros complexos com outros cofatores. O incremento de pigmentos poliméricos e o decréscimo de antocianinas monoméricas, verifica-se ao longo da maturação e envelhecimento de vinho, sendo que a cor evolui de vermelho vivo para um vermelho acastanhado (Somers, 1971).

2.2.2 Copigmentação

O fenómeno de copigmentação ocorre nos vinhos e contribui entre 30 a 50% para a cor de vinhos jovens (Darias-Martin *et al.*, 2001), dependendo do tipo e concentração de antocianinas e cofatores, do pH do meio, da temperatura e do etanol em solução.

Pode-se distinguir dois tipos de copigmentação: a copigmentação intramolecular; e a copigmentação intermolecular entre antocianinas e outros compostos.

A auto-associação trata-se de um caso particular de copigmentação intramolecular em que ocorre a estabilização pela associação de duas ou mais moléculas de antocianina. O mecanismo corresponde a interações de empilhamento vertical de moléculas de antocianinas e estabilizadas através de interações hidrofóbicas que ocorrem entre os núcleos aromáticos (Hoshino *et al.*, 1980; Hoshino *et al.*, 1982; Goto and Kondo, 1991).

A copigmentação intramolecular é restrita a antocianinas aciladas em que as antocianinas e os copigmentos estão ligados por ligações covalentes ao mesmo resíduo de açúcar. Esta interação, através de interações hidrofóbicas, entende-se por mais forte e efetiva a estabilizar a cor das antocianinas que a copigmentação intermolecular provavelmente devido a força das ligações (Brouillard, 1982)

A copigmentação intermolecular consiste numa interação molecular por ligações de hidrogénio e interações hidrofóbicas entre as antocianinas e outras moléculas (não coradas) que atuam como copigmentos (Asen *et al.*, 1972; Brouillard, 1983; Dangles *et al.*, 1993). Assim sendo, podem atuar como copigmentos os flavanóides (especialmente os flavan-3-óis), os ácidos fenólicos, os alcaloides, os aminoácidos, os ácidos orgânicos, os polissacáridos e os catiões metálicos (Mg^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+}) (Davies and Mazza, 1993). A proporção destes compostos nos vinhos depende da casta, do ano vitícola e dos processos enológicos, o que torna a cor dos vinhos diferente.

Do fenómeno de copigmentação, resulta uma intensificação da cor (efeito hiperocrómico) que poderá ser acompanhada por um deslocamento do comprimento de onda máximo para valores superiores (efeito batocrómico). Contribui ainda para a estabilização de antocianinas monoméricas e consequente estabilização da cor, em vinhos jovens.

2.2.3 Reação das antocianinas com o bissulfito

O dióxido de enxofre (SO_2) é um produto altamente utilizado na produção dos vinhos, uma vez que atua como antioxidante e antissético. Contudo, a adição de SO_2 resulta na descoloração reversível das antocianinas monoméricas (Figura 15) (Timberlake and Bridle, 1966).

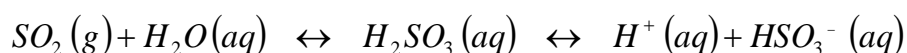


Figura 15 - Reação reversível do bissulfito com as antocianinas

O dióxido de enxofre (SO_2), em solução aquosa, dá origem ao anião bissulfito (HSO_3^-) que se liga rapidamente ao carbono 4 do catião flavílio de um modo reversível, originando um aduto incolor. O bissulfito pode também ligar-se à posição 2 da antocianina, resultando igualmente numa estrutura sem cor. As constantes de equilíbrio desta reação são elevadas, indicando que quantidades pequenas de SO_2 podem descorar grandes quantidades de antocianinas (Timberlake and Bridle, 1966). Acidificando o meio, o equilíbrio desloca-se no sentido de formação do catião flavílio e a solução volta a adquirir a cor vermelha. O efeito de descoloração aumenta à medida que o pH aumenta.

Contrariamente às antocianinas livres, as antocianinas polimerizadas não descolorem com a adição de bissulfito (Dallas and Laureano, 1994).

3. Vinho do Porto

Dentro de toda a gama de vinhos produzida em Portugal e nas ilhas, o vinho do Porto é considerado como a imagem mais emblemática e um dos seus produtos mais nobres. É produzido na Região Demarcada do Douro através de um tradicional processo de fabrico que consiste na paragem de fermentação pela adição de aguardente vínica 77% (aguardentação), lotação de vários vinhos e pelo envelhecimento o que permite distinguir-se dos demais pelas suas características especiais. Desta forma obtém-se uma grande diversidade de tipos a que se atribui designações diferentes.

O tipo de envelhecimento e cor são indicadores do tipo de vinho do Porto que se pretende produzir podendo-se dividir em quatro grandes categorias: Ruby, Tawny, Branco e Rosé. Dentro destas categorias temos as categorias especiais de vinho do Porto que devem obedecer a determinadas características físico-químicas e organoléticas de acordo com o regulamento nº 36/2005 do IVDP.

De modo geral, um vinho Ruby é obtido ao impedir a evolução da sua cor tinta, mantendo o aroma frutado e o típico vigor de um vinho jovem, enquanto que um Tawny resulta de uma evolução de cor e aroma pelo seu estágio em barricas ou tonéis (condições de oxidação) e pela lotação de vinhos com diferentes graus de envelhecimento, como se pode ver na Figura 16.

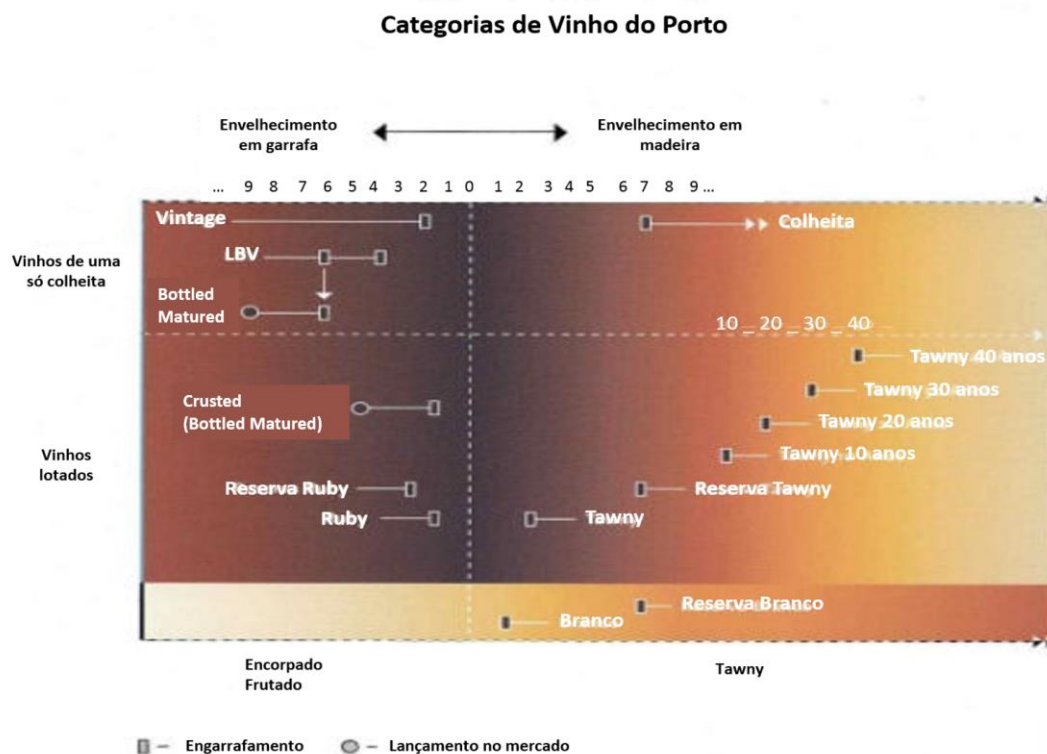


Figura 16 - Categorias de vinho do Porto (IVDP, 2004)

Cabe ao enólogo conhecer e analisar a produção para que, de acordo com os objetivos, se possa produzir o vinho dentro da gama pretendida. Pretende-se deste modo dizer que a escolha do método de extração e condições de envelhecimento vão ditar o tipo de produto que se quer obter uma vez terem um papel muito importante na conceção de qualquer categoria de vinho.

4. Colagem

A colagem é uma prática de estabilização, que consiste na clarificação de vinhos, de modo a melhorar as suas características. Este processo promove ainda a redução da adstringência nos vinhos, pela eliminação de compostos fenólicos; a melhoria da sua limpidez, o aumento da filtrabilidade e o reforço da estabilidade.

Trata-se de uma técnica muito importante para o aspeto visual do vinho, e consequente requerimento de qualidade imperativo para qualquer consumidor. Para se obter o resultado pretendido, a cola deverá ter efeitos mínimos na composição aromática do vinho e deverá permitir a claridade e o aroma característico durante o período de consumo.

O processo de colagem consiste na incorporação de uma substância capaz de induzir a floculação e arrastar consigo todas as partículas grandes em suspensão, em vinhos turvos ou com instabilidade coloidal de forma que, quaisquer que sejam as condições de armazenamento, os vinhos estejam estabilizados.

Em vinhos jovens, a ação da gravidade é significativa ao depositar algumas das partículas em suspensão resultantes dos processos enológicos envolvidos ao longo da sua produção. Os fatores externos como a temperatura, o oxigénio e os taninos elágicos da madeira promovem ou inibem essa precipitação. Os vinhos tornam-se clarificados, pela trasfega do vinho limpo para outro recipiente. Este processo ocorre naturalmente e relativamente rápido em vinhos tintos e brancos, mas ocorre mais lentamente em vinhos doces como o caso do Vinho do Porto ou em Colheita Tardia, produzidos com uvas afetadas por podridão nobre.

As colas são normalmente misturas de proteínas desnaturadas que precipitam, dependendo de diferentes fatores, como os taninos, catiões, temperatura, coloides protetores ou devido á acidez (possibilidade de sobrecolagem). Entre eles temos: gelatina, albumina, caseína e cola de peixe. Podem também ser de origem mineral e flocular em contato com os catiões do vinho, como o caso da Bentonite; ou também de origem sintética, como é o caso do PVPP.

Comportam-se de maneira diferente dependendo da composição, origem e modo de preparação sendo desta forma indispensável conhecer as suas características para entender os mecanismos de colagem para se obter os objetivos propostos.

Este estudo foi realizado usando gelatinas (colas proteicas), produzidas pela hidrólise quase completa do colagénio presente na pele de porco ou ossos de animais (Lagune and Glories, 1996a) bem como bentonite, mistura de argilas constituída maioritariamente por montmorilonite.

Estas colas possuem características físico-químicas diferentes sobretudo a distribuição do peso molecular, ponto isoelétrico e densidade de carga à superfície.

De acordo com a investigação de Ribéreau-Gayon, iniciada em 1934 (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1977), sabe-se que a colagem usando colas proteicas se divide em duas fases: floculação, causada pelas interações entre taninos e proteínas; e clarificação, causada pela eliminação da matéria em suspensão no vinho.

Na primeira fase, as proteínas, coloides hidrofóbicos carregados positivamente, são convertidas em coloides carregados negativamente. Dependendo de alguns fatores (pH, temperatura, [taninos], [proteínas]), formam-se complexos pela associação das proteínas e dos taninos, que precipitam na presença de catiões.

A clarificação corresponde à eliminação do material em suspensão, que envolve o fenómeno de complexação entre a cola e os compostos responsáveis pela turbidez. As proteínas que não reagiram com os taninos podem combinar-se com as partículas em suspensão, ocorrendo na ausência de taninos (Figura 17) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1977).

A dosagem de cola a aplicar num vinho é importante, uma vez que pode ocorrer um fenómeno denominado sobrecolagem. Este fenómeno ocorre quando as proteínas adicionadas ao vinho não flocularam, o que torna o vinho instável. Apesar de parecer límpido, qualquer contacto ou adição de taninos, torna o vinho turvo.

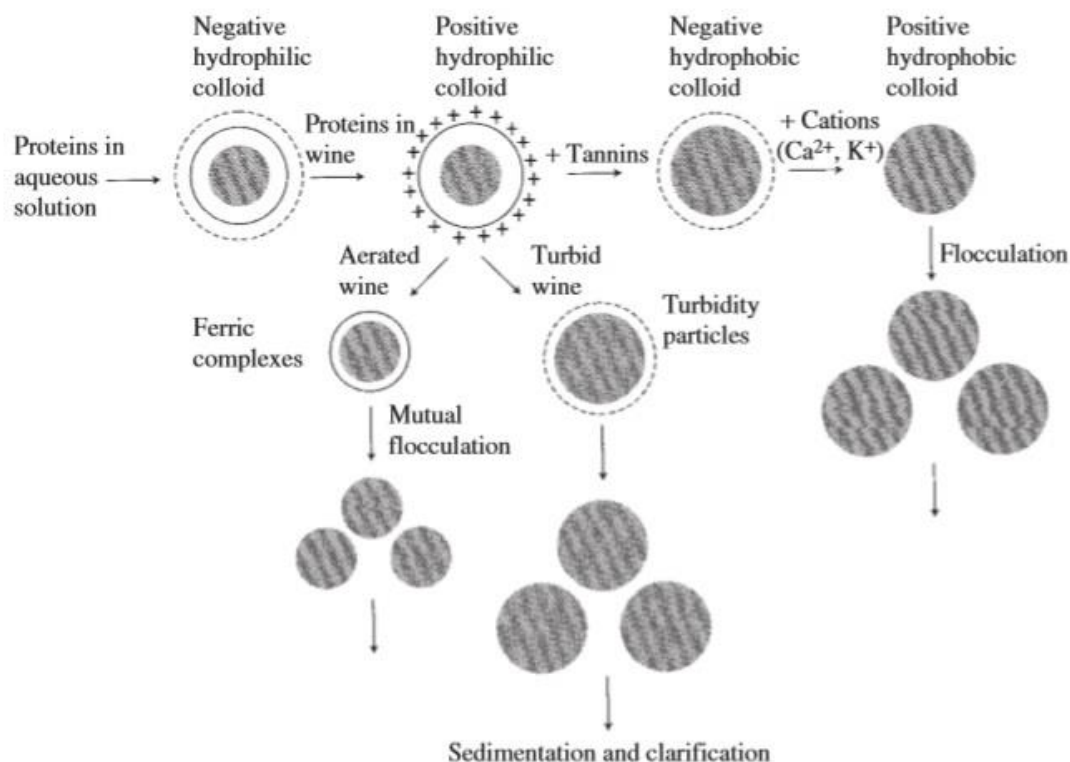


Figura 17 - Mecanismo de floculação de proteínas durante a colagem (Ribéreau-Gayon et al., 1977)

A bentonite é um produto usado normalmente na clarificação de vinhos jovens, eliminação da matéria corante coloidal e facilita a precipitação das colas proteicas reduzindo o risco de ocorrer casse proteica (turvação). A sua ação varia de acordo com o rácio de catiões maioritários (Na^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}) e minoritários (Fe^{2+} , K^+ e Cu^+) nas camadas internas ou na superfície externa das partículas de argila que por sua vez varia com a proveniência geográfica.

Dividem-se em função dos catiões de troca em 3 tipos diferentes bentonites naturais sódicas, bentonites naturais cálcicas e bentonites ativadas cálcicas. A ativação é realizada para se obter propriedades semelhantes as bentonites naturais cálcicas (rácio $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ alto), que aumenta a capacidade de ligação com as proteínas (Catarino *et al.*, 2008).

Para determinar qual o tipo de cola e a dose de aplicação, devem ser realizados testes de colagem com a respetiva análise sensorial e análise química.

Do ponto de vista organolético, a colagem não deve levar a mudanças positivas ou negativas. Quando bem conduzida, utilizando produtos de boa qualidade e doses adequadas, não modifica as qualidades organoléticas dos vinhos.

Material e Métodos

O presente estudo consistiu na avaliação do efeito das diversas colas comerciais, nas diferentes frações fenólicas, tendo sido escolhidas duas categorias de vinho do Porto, da empresa Gran Cruz Porto – Sociedade Comercial de Vinhos Lda., sendo um deles um Ruby e o outro um Tawny. Escolheu-se estas duas categorias distintas de forma a verificar se haveria uma diferença na aplicação das colas e pelo seu processo de fabrico que leva à consequente diferença na composição polifenólica destes dois vinhos.

Para cada categoria de vinho foram realizados testes de colagem com 4 colas proteicas diferentes e dois tipos de bentonites.

1. Preparação das amostras

Inicialmente prepararam-se as soluções de bentonite diluindo em 20 vezes o seu volume em água para posteriormente serem adicionados ao vinho.

As colagens foram realizadas nos vinhos Tawny e Ruby adicionando a gelatina na dose máxima recomendada pelo fabricante e 40 g/hL de cada bentonite conforme descrito no Quadro 1. Após homogeneização, as amostras foram deixadas em contato com a cola durante quatro dias ao abrigo da luz e tapadas para evitar a oxidação. Posteriormente foram passadas a limpo e filtradas num equipamento de filtração de bancada com a adaptação de um filtro de cartuchos de 0,6 µm. Foi usada uma amostra não tratada como controlo e todas as colagens foram realizadas em triplicado.

Quadro 1 - Doses aplicadas em cada ensaio

Amostras	Dose
Cola 1	80 mL/hL
Cola 2	100 mL/hL
Cola 3	30 mL/hL
Cola 4	80 mL/hL
Bentonite A	40g/hL
Bentonite B	40g/hL

2. Caraterização das colas

2.1 Separação de proteínas por SDS-PAGE em sistema Tris-Glicina

Para determinar a composição em proteínas das diferentes colas usadas neste estudo foi usado um sistema de eletroforese em gel. Pela ação de um campo elétrico é provocada uma migração de acordo com a sua massa molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) usando um gel de separação 15 % acrilamida e gel de empacotamento a 5% acrilamida.

Todas as amostras foram preparadas em tampão de aplicação em SDS- PAGE (125 Mm Tris-HCl pH 6,8, 20% glicerol, 4% SDS, 10% mercaptoetanol e 0,04% azul bromofenol) e aquecidos a 95°C durante 10 min com agitação. A ASB foi usada como amostra padrão. O tampão de eletroforese Tris-Glicina 10x foi 250 mM Tris-HCl 8,8, 1,92 M Glicina e 1% SDS. A migração das proteínas foi atingida por uma corrente elétrica 120 V.

Após eletroforese, os géis foram colocados em contacto com solução corante azul de Coomassie R-250 durante 12h. Para descorar, os géis foram lavados com água.

2.2 Separação de proteínas SDS-PAGE em sistema Tris-Tricina

De forma a se obter uma separação de proteínas de baixo peso molecular (inferior a 15 kDa) optou-se pelo método SDS-PAGE em sistema Tris-Tricina. Neste sistema é provocada a separação pela ação de um campo elétrico por eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) usando um gel de separação 16% acrilamida e gel de empacotamento a 5% acrilamida.

Todas as amostras foram preparadas em tampão de aplicação (100 Mm Tris-HCl pH 6,8, 24% glicerol, 8% SDS, 5% mercaptoetanol e 0,02% azul bromofenol) e aquecidos a 65-70°C durante 10 min com agitação.

São necessários dois tampões, um para o cátodo (100 mM Tris, 100 mM Tricina e 1% SDS) e um para o ânodo (0,2 mM Tris.HCl pH 8,9) onde a migração das proteínas é atingida por uma corrente elétrica de 150 V.

Após eletroforese, os géis foram colocados em contacto com solução corante azul de Coomassie R-250 durante 12h. Para descorar, os géis foram lavados com água.

3. Estudo da composição polifenólica dos vinhos

3.1 Análise da Cor

3.1.1 Intensidade Corante

A determinação da intensidade corante das amostras é realizada de acordo com o método OIV tipo IV. Este método consiste na leitura das absorvâncias das amostras de vinho filtradas (0,45 µm) aos comprimentos de onda de 420, 520 e 620 nm usando células de vidro de 1 mm num espectrofotómetro UV-Visível *Thermo Scientific Evolution Array*.

O cálculo da intensidade corante é dado pelo somatório das absorvâncias dos três comprimentos de onda.

$$IC = (Abs\ 420 + Abs\ 520 + Abs\ 620) \times 10$$

3.1.2 CIELab

O sistema CIELab consiste num método descrito pelas três qualidades específicas da sensação visual: tonalidade (h), luminosidade (L) e cromaticidade (C). A luminosidade (L) corresponde à transmitância e varia inversamente com a densidade corante do vinho. Os valores de luminosidade oscilam entre 0 (para uma amostra completamente opaca) e 100 (para uma amostra completamente transparente). A percepção cromática de uma amostra é definida essencialmente pela sua tonalidade e pelo seu croma. A saturação (C) corresponde à maior ou menor monocromaticidade do vinho e a tonalidade (h) corresponde ao seu comprimento de onda dominante. A tonalidade e o croma exprimem-se pelas coordenadas de cromaticidade a^* e b^* , que indicam dois eixos de cores antagónicas: o eixo a^* que varia de vermelho ($+a^*$) e verde ($-a^*$) e o eixo b^* que varia de amarelo ($+b^*$) a azul ($-b^*$). Para ambos os eixos, o zero indica cinzento neutro (Figura 18).

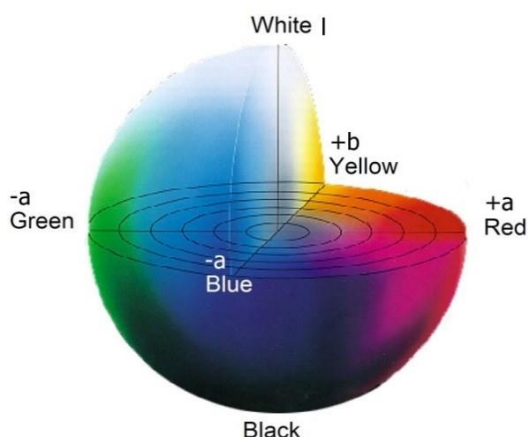


Figura 18 - Círculo Cromático

Da mesma forma que a leitura intensidade corante este método também é aprovado pela OIV tratando-se de um método tipo I pela análise espectrofotométrica. Foram realizadas leituras das amostras aos comprimentos de onda de 450, 520, 570 e 630 nm num espectrofotômetro UV-Visível *Thermo Scientific Evolution Array* e células de vidro de percurso ótico de 2 mm.

Para determinar os componentes tricromáticos: X, Y e Z e as respectivas coordenadas L^* , a^* e b^* e magnitudes derivadas C^* e H^* foi utilizado um software adequado, Colorwin – MSCV® Coordinates (LR-846-2001).

3.1.3 Análise das antocianinas

3.1.3.1 Antocianinas livres totais

A quantidade de antocianinas livre totais foi determinada através de uma adaptação do método do bissulfito de acordo com a literatura (Somers and Evans, 1976). Este consiste na ação do bissulfito sob as antocianinas livres tornando-as incolores. À medida que o vinho envelhece, as antocianinas evoluem levando a formação de pigmentos mais polimerizados e mais estáveis tornando-se por isso mais resistentes a descoloração.

Num matraz foram adicionados 40,00 mL de HCl 2%, 2,00 mL de etanol e 2,00 mL de cada amostra de vinho. Posteriormente, 10 mL desta solução foram adicionados a três tubos de ensaio e 4,00 mL de bissulfito de sódio 20%. Um quarto tubo foi preparado como referência em que o bissulfito foi substituído por água desionizada. Todos os tubos foram homogeneizados no vórtex e mantidos ao abrigo da luz durante 20 minutos. De seguida, mediu-se a absorvância de todas as soluções a 520 nm em

células de vidro de percurso ótico de 10 mm num espectrofotómetro UV/Vis Thermo Scientific Evolution Array.

A quantidade de antocianinas livres que reage foi determinada através da diferença entre a absorvância da solução de referência e a absorvância das amostras:

$$\Delta \text{ Abs} = \text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{referência}}$$

O teor de antocianinas livres totais (mg.L^{-1}) presentes em cada amostra de vinho foi determinado utilizando a reta de calibração obtida a partir de uma solução padrão de malvidina-3-glucósido:

$$\begin{aligned} \text{Reta de calibração: } y &= 0,0015x + 0,00024 \\ [\text{Vinho}] (\text{mg/L}) &= (\text{Abs } 520 - 0,00024) / 0,0015 \end{aligned}$$

3.1.3.2 Quantificação de antocianinas por HPLC

As amostras de vinho foram analisadas diretamente por HPLC (Thermo Scientific) equipado com um detetor DAD (Thermo Scientific Spectra System UV8000) por injeção de 20 μL , numa coluna Merck de fase reversa (C18 250 x 4,6 mm d. i.), segundo o método descrito na literatura (Oliveira *et al.*, 2006).

Os solventes utilizados foram: solvente A – $\text{H}_2\text{O}/\text{HCOOH}$ (9:1) e o solvente B - $\text{HCOOH}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1:3:6). A eluição decorreu com um fluxo 1 mL/min de acordo abaixo descrito (Quadro 2):

Quadro 2 - Gradiente de eluição utilizado na análise das antocianinas totais

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	80	20
70	15	85
75	0	100
85	0	100
90	80	20

As antocianinas 3-monoglucosídicas foram determinadas pela análise de espectros de absorção e os tempos de retenção dos respetivos padrões (Figura 19).

A concentração das antocianinas foi calculada a partir de uma reta de calibração de calibração obtida por injeção de padrões de malvidina-3-glucósido. As análises foram efetuadas em duplicado e os resultados expressos em mg/L.

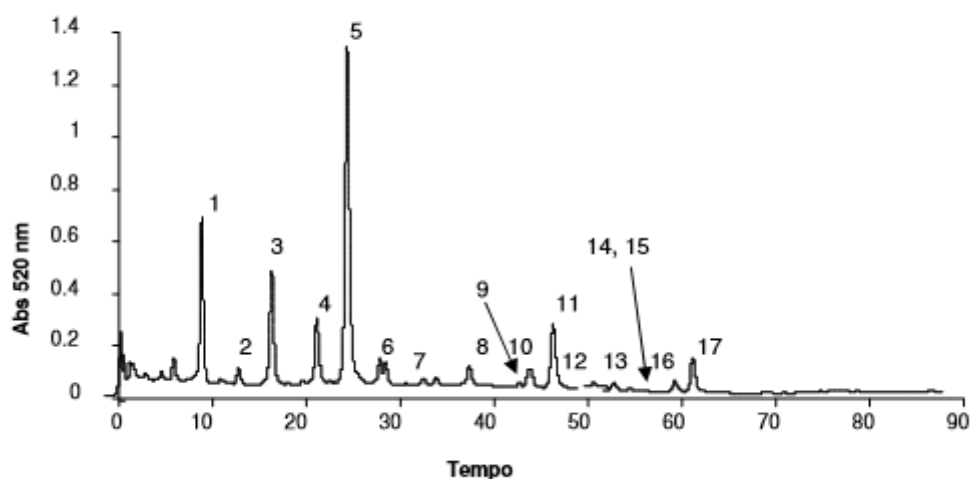


Figura 19 - Cromatograma de HPLC do perfil de antocianinas num vinho jovem

Legenda:

- | | |
|---------------------------------------|--|
| 1. 3-glucósido de delphinidina; | 10. 3-cumaroílglicosido de delphinidina; |
| 2. 3-glucósido de cianidina; | 11. 3-acetilglucósido de malvidina; |
| 3. 3-glucósido de petunidina; | 12. 3-cumaroílglicosido de cianidina; |
| 4. 3-glucósido de peonidina; | 13. 3-cafeóílglicosido de peonidina; |
| 5. 3-glucósido de malvidina; | 14. 3-cumaroílglicosido de petunidina; |
| 6. 3-acetilglucósido de delphinidina; | 15. 3-cafeóílglicosido de malvidina; |
| 7. 3-acetilglucósido de cianidina; | 16. 3-cumaroílglicosido de peonidina; |
| 8. 3-acetilglucósido de petunidina; | 17. 3-cumaroílglicosido de malvidina. |
| 9. 3-acetilglucósido de peonidina; | |

3.1.4 Índice de fenóis totais

O Índice de fenóis totais é um indicador da quantidade total de fenóis que contem a amostra em análise. Consiste na leitura espectrofotométrica usando um espectrofotômetro UV-Visível Thermo Scientific Evolution Array e células de quartzo de percurso ótico de 10 mm.

Os vinhos são diluídos numa proporção de 1:100 com uma solução sintética água/etanol 12% (v/v) com 5,0 g/L de ácido tartárico a pH 3,50. O máximo de absorção destes compostos localiza-se no comprimento de onda a 280 nm uma vez que os anéis benzénicos absorvem na região do ultra-violeta.

O índice de fenóis totais é calculado através da expressão:

$$IFT = \text{Abs } 280 \times \text{f.d.}$$

$$\text{f.d.} = 100$$

3.1.5 Taninos proantociânicos totais

A determinação de taninos proantociânicos totais teve por base o método descrito na literatura (Ribéreau-Gayon and Stonestreet, 1966; Darné, 1991). Tem como princípio a reação de Bate-Smith da decomposição de taninos condensados (procianidinas e prodelphinidinas) que em meio ácido e pela ação do calor quebram ligações libertando as formas coradas, as antocianidinas.

Como se trata de um método em que a amostra sofre a ação do calor e a vinho em análise se trata de um vinho generoso rico em açúcares, é necessário que este seja pré-purificado em “flash” cromatografia em gel de sílica C18 de fase reversa, para que se evite a caramelização e consequente formação de pigmentos que afetem a leitura. A amostra é recolhida com metanol onde seguidamente é evaporada à secura com recurso a um evaporador rotativo sendo recolhida do recipiente pela adição de 5,00 mL de solução sintética (água/metanol 12% (v/v), 5,0 g/L de ácido tartárico e pH 3,50).

Assim, 4,0 mL da amostra previamente diluída (diluição 1:50), 2,0 mL de água desionizada e 6,0 mL de HCl 37% são adicionados a 4 tubos de hidrólise. Um dos tubos não é sujeito ao aquecimento para ser usado como referência.

Os tubos foram rolhados e levados para o banho-maria a 100°C durante 30 minutos. Após este aquecimento, os tubos são arrefecidos em água fria e ao abrigo da luz durante 10 minutos. Passado este tempo, retiraram-se os tubos da água, cobriram-

se com papel de alumínio e adicionou-se 1,00 mL de etanol a cada tubo de hidrólise para estabilizar a cor das antocianinas, agitando-se de seguida num vórtex.

Foi medida a absorvância de cada solução a 520 nm em células de vidro de percurso ótico de 10 mm num espectrofotómetro UV-Visível Thermo Scientific Evolution Array. O valor de absorvância é obtido pela subtração do valor de absorvância de cada ensaio pelo valor de absorvância da solução de referência:

$$\Delta \text{ Abs} = \text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{referência}}$$

Este teste foi realizado em triplicado e é calculado o teor de procianidinas (g.L^{-1}) através de uma reta de calibração obtida pela mistura de procianidinas oligoméricas:

$$\text{Reta de calibração: } y = 0,0456x + 0,0178$$

$$[\text{Vinho}] (\text{g/L}) = (\Delta \text{ Abs} - 0,0178) / 0,0456$$

3.1.6 Índice de Diálise

Este teste permite verificar a complexidade do vinho através do cálculo da percentagem de compostos polimerizados que ficam retidos na membrana de diálise descrito na literatura (Glories, 1978).

Numa membrana de diálise de 25 cm (membrana semipermeável, MWCO de 12 a 14 kDa, 6,4 mm de diâmetro) são introduzidos 5,0 mL da amostra de vinho que por sua vez é colocada num frasco de vidro com 50 mL de solução sintética (água/etanol 12% (v/v), 5 g/L de ácido tartárico e pH igual a 3,5). Uma solução de referência é preparada para cada amostra, diluindo o vinho 10 vezes com uma solução sintética de vinho.

Após estarem selados, os frascos são mantidos ao abrigo da luz durante 24 horas e posteriormente é medida a absorvância a 280 nm das soluções dialisadas e das referências num espectrofotómetro UV-Visível Thermo Scientific Evolution 201, utilizando uma célula de quartzo de percurso ótico de 10 mm.

O índice de diálise foi calculado através da seguinte expressão:

$$\text{I.D.} = (D_o - D) / D_o, \text{ sendo } D_o \text{ a solução de referência.}$$

3.1.7 Poder Tanante

Trata-se de um método nefelométrico em que se verifica qual capacidade dos taninos do vinho têm em formar agregados insolúveis com a albumina sérica bovina (Bonafe *et al.*) (De Freitas, 1995).

As amostras de vinho foram diluídas 50 vezes com solução sintética água/etanol 12% (v/v) com 5,0 g/L de ácido tartárico a pH igual 3,50. As leituras são realizadas em quintuplicado sendo necessários 5 tubos de ensaio com 4,0 mL da solução diluída anteriormente.

Após agitação no vórtex, o valor de turbidez das amostras foi lido num turbidímetro HACH 2100N equipado para ler tubos de 100x12 mm. Esta leitura determina a turbidez da amostra sem a ASB (Albumina Sérica Bovina). Seguidamente adicionaram-se 150 µL da solução de proteína (Bonafe *et al.*) 0,8 g/L em cada tubo para depois agitar novamente no vórtex e manter ao abrigo da luz durante 30 minutos. Ao fim desse tempo foi lida a turbidez.

O poder tanante dos vinhos é expresso em unidades de turbidez (NTU) por mL de vinho, de acordo com a seguinte expressão:

$$\text{Turbidez (NTU/mL de Vinho)} = (\text{Turbidez amostra} - \text{Turbidez branco}) / 0,08$$

3.1.8 Análise dos Flavan-3-óis

3.1.8.1 Extração líquido-líquido

Num funil de separação a 30 mL de amostra são realizadas três extrações com acetato de etilo (20 mL) onde se separa a fase aquosa da fase orgânica. São rejeitadas as fases aquosas e a totalidade da fração orgânica é levada à secura num evaporador rotativo sob vácuo ($T \approx 30^\circ\text{C}$), e o resíduo recuperado em 2,00 mL de metanol.

3.1.8.2 Fracionamento de Catequinas e Procianidinas diméricas e triméricas por cromatografia líquida em coluna de gel TSK Toyopearl HW-40(S)

O extrato recuperado da fase de extração anterior foi aplicado numa coluna de gel Toyopearl HW-40(S) (250 x 25 mm i.d.) eluída com metanol 99,8% com um fluxo de 0,8 mL/min. São obtidas duas frações de forma a separar os compostos com diferentes graus de polimerização. A 1ª fração é recolhida nos primeiros 150 min de fracionamento onde se separam os compostos menos polimerizados, ao passo que nos seguintes 150 min, é recolhida a 2ª fração contendo os compostos mais polimerizados. Cada fração foi evaporada num evaporador rotativo sob vácuo ($T \approx 30^\circ\text{C}$) e o resíduo recuperado em 2,0 mL de solução sintética (água/etanol 12% v/v) a pH 3,50 onde foi congelado para posterior análise por HPLC. Para recuperar o resíduo foram usados 2,0 mL de solução para garantir que era todo recuperado.

3.1.8.3 Análise dos flavonóis por HPLC

As frações obtidas foram analisadas por HPLC por injeção direta (40 μL) usando duas colunas Merck de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm i.d.) de acordo com o método descrito na literatura (de Freitas *et al.*, 1998). Os solventes utilizados foram A, $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ 2,5% (v/v), e o B, CH_3CN /solvente A (8:2). A eluição decorreu a um fluxo de 1,0 mL/min e de acordo com gradiente de concentração descrito no seguinte Quadro 3:

Quadro 3 - Gradiente de eluição na análise das catequinas e procianidinas oligoméricas

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	93	7
5	93	7
90	80	20
95	0	100
105	0	100
110	93	7

Os cromatogramas foram obtidos a 280 nm e apresentam um perfil cromatográfico semelhante ao das seguintes Figura 20 e Figura 21:

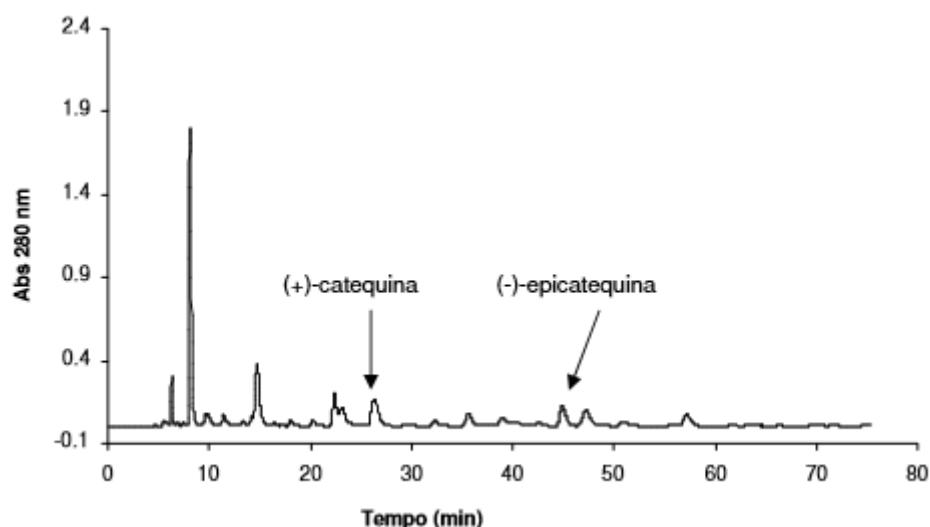


Figura 20 - Cromatograma de HPLC da fração 1 de um vinho

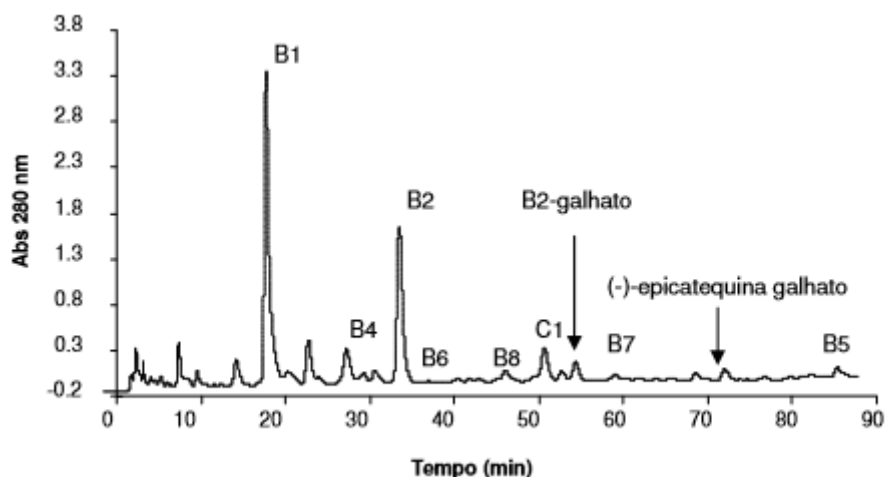


Figura 21 - Cromatograma de HPLC da fração 2 de um vinho

Tal como a fração 1, a fração 2 foi analisada por HPLC por injeção direta de 40 μL seguindo o mesmo procedimento anterior.

Para determinar a concentração das catequinas e procianidinas oligoméricas, expressa em mg.L^{-1} , foram usadas retas de calibração obtidas pelos padrões respetivos sintetizados no laboratório e segundo os métodos descritos na literatura (Geissman and Yoshimur, 1966; Michaud *et al.*, 1973). Por injetarmos o dobro da quantidade de amostra no HPLC recomendada pelo método, todos os resultados são, desta forma, divididos por 2.

Relativamente às segundas frações do vinho Tawny foram injetados 80 μL para que fosse possível ver picos mais definidos.

3.1.9 Doseamento de fenóis totais – Índice de Folin-Ciocalteu

O método do Índice de Folin-Ciocalteu permite o doseamento de fenóis totais no vinho de acordo com o procedimento descrito na literatura (Singleton and Rossi, 1965).

Consiste na leitura por leitor de placas de 96 poços (Biotek Powerwave XS) com um software KC4 obtendo-se o doseamento a partir da reação em meio alcalino. Os compostos fenólicos reduzem a mistura dos ácidos fosfotungsténico e fosfomolibdénico em óxidos de tungsténio e de molibdénio de cor azul. A coloração obtida na reação apresenta um máximo a 750 nm e quanto mais intensa maior a concentração de compostos fenólicos na amostra.

Em cada microtubo foram colocados 15 µL de amostra no caso do Tawny e amostra diluída 1:20 para o Ruby (usando para o branco 15 µL de SMV), 75 µL de reagente de Folin e 500 µL de H₂O destilada. É levado ao vórtex para serem posteriormente adicionados 300 µL de carbonato de sódio 20% e 610 µL de H₂O destilada para ser novamente ao homogeneizado. Para que ocorra a reação, deixamos a repousar à temperatura ambiente durante 30 min. Colocamos 350 µL desta solução em cada poço (leitura em triplicado) para ser colocada no leitor de placas. A leitura é obtida a 750 nm. O teor de fenóis totais é expresso em mg equivalentes de ácido gálico.mL⁻¹, através da curva de calibração obtida a partir do ácido gálico.

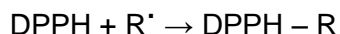
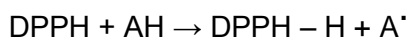
3.1.10 Propriedades antioxidantes

3.1.10.1 Capacidade antiradicalar – DPPH

O método consiste na utilização de um radical livre e estável, o DPPH[•], (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), de coloração púrpura, que vai ser reduzido ao entrar em contato com uma outra substância, o antioxidante numa solução de metanol segundo o método descrito na literatura (Bondet *et al.*, 1997).

A redução da concentração do DPPH é monitorizada pelo decréscimo da absorvância no comprimento de onda específico, durante a reação. Na sua forma radical, o DPPH absorve a 515 nm mas após a redução por um antioxidante ou uma espécie radical, a absorção desaparece.

A reação do radical livre DPPH com um antioxidante (AH) ou uma espécie radical (R[•]) ocorre de acordo com as equações 1 e 2:



A capacidade de neutralizar radicais livres pode ser avaliada usando o DPPH como radical livre.

É lido através do leitor de placas de 96 poços (Biotek Powerwave XS, com um software KC4), aplicando o radical livre DPPH. A reação foi efetuada numa placa de poços a temperatura aproximada 22-23°C.

Efetuuou-se a preparação de uma solução do radical, na qual se colocou 0,0012 g de DPPH num balão de 50,0 mL e dissolvido em metanol. Numa placa de 96 poços, colocaram-se 270 µL de solução e 30 µL de amostra diluída 1:10 para o Tawny e 1:20 para o Ruby. Para determinar o branco usou-se 30 µL de SMV (solução sintética água/etanol 12% (v/v) com 5,0 g.L⁻¹ de ácido tartárico, a pH 3,50).

Realizaram-se medições de absorvância a 515 nm, com intervalos de 5 min durante 20 min.

Os resultados foram efetuados em triplicado e expressos em µM equivalentes de Trolox, após realização de uma curva de calibração utilizando diferentes concentrações do composto.

3.1.10.2 Avaliação do poder redutor – FRAP

Para avaliação do método redutor usamos o método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) com algumas modificações (Benzie and Strain, 1996).

Esta técnica baseia-se na redução do complexo de tripiridiltriazina férrica [Fe(III)-TPTZ₂]³⁺ a tripiridiltriazina ferrosa [Fe(Skury *et al.*)-TPTZ₂]²⁺, por um antioxidante a pH cerca de 3,6. Detetamos a reação através de espectrofotometria tendo um máximo de absorção a 593 nm.

O reagente FRAP é preparado juntando 10 mL de tampão acetato 300 mM, pH 3,6; 1,00 mL de solução 10 mM de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) em 40 mM de HCl e 1,00 mL de solução de FeCl₃ 20 mM. De seguida, diluiu-se a 10 mL da solução obtida em 20 mL de tampão acetato, e colocado na estufa durante um período de 10 minutos. Posteriormente, transferiu-se 270 µL do reagente FRAP para placa e adicionou-se 30 µL de vinho diluído (Tawny 1:10 e Ruby 1:20). O branco foi efetuado com 270 µL de reagente FRAP e 30 µL de SMV.

A avaliação do poder redutor foi determinada num leitor de placas tal como para os dois métodos anteriores a um comprimento de onda de 593 nm, ao tempo 0 e 4 minutos e a uma temperatura de 37° C. Os ensaios foram efetuados em triplicado e os resultados foram expressos em μM equivalentes de trolox, usando uma curva de calibração obtida a partir de soluções padrão deste composto com diferentes concentrações.

4. Análise Estatística

Para análise estatística deste estudo, os ensaios foram realizados em triplicado. Os valores foram expressos com médias aritméticas \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas foram avaliadas através da análise de variância a um factor (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni para comparações entre dois grupos. Foram consideradas significativas as diferenças com $P < 0,05$.

Resultados e Discussão

1. Análise físico-química

No Quadro 4 são apresentadas as análises sumárias realizadas periodicamente pela empresa para controlo de qualidade:

Quadro 4 - Análise química inicial das duas amostras de Vinho do Porto

	Tawny (0501)	Ruby (A413)
Álcool (% vol.)	19,51	18,57
Baumé	2,8	3,4
Massa Volúmica	1,0178	1,219
Acidez Total (g/L ácido tartárico)	3,55	4,6
pH	3,68	3,61
Acidez Volátil (g/L ácido acético)	0,25	0,18
SO₂ Total (mg/L)	56	56
Condições Microbiológicas	Conforme	Conforme

2. Análise visual do teste de colagem

Após a sedimentação da cola e arrastamento dos compostos foi adquirida a quantidade de borras pela medição direta do volume de borras formado.

Quadro 5 - Percentagem de borra formada.

Amostras	Percentagem de borra
Tawny + Cola 1 + Bentonite A	4,11% ± 1,50
Tawny + Cola 2 + Bentonite A	2,86% ± 0,00
Tawny + Cola 3 + Bentonite A	1,24% ± 0,22
Tawny + Cola 4 + Bentonite A	2,83% ± 0,33
Tawny + Cola 4 + Bentonite B	3,05% ± 0,29

Os resultados obtidos foram expressos em percentagem de acordo com a quantidade inicial de vinho no Quadro 5. Só foi determinada a quantidade de borra formada no Tawny uma vez que no Ruby apenas se observou formação de uma ligeira camada. Estes valores são importantes para ter uma perspetiva da percentagem de borra formada como mais um fator na escolha da cola a aplicar.

3. Caraterização das colas

Pela separação das proteínas pelo método de SDS-PAGE Tris-Glicina podemos observar que no conjunto das colas escolhidas que a mistura de proteínas e péptidos tem pesos moleculares abaixo de 14 kDa logo concluímos que se tratam de gelatinas líquidas altamente hidrolisadas (Versari *et al.*, 1998).

As colas 2, 3 e 4 apresentaram perfis muito semelhantes enquanto que a cola 1 não apresenta qualquer perfil o que leva a concluir que, apesar de se tratar de uma gelatina pouco hidrolisada, a concentração de proteína nesta cola é muito inferior quando comparada com as outras três (Figura 22).

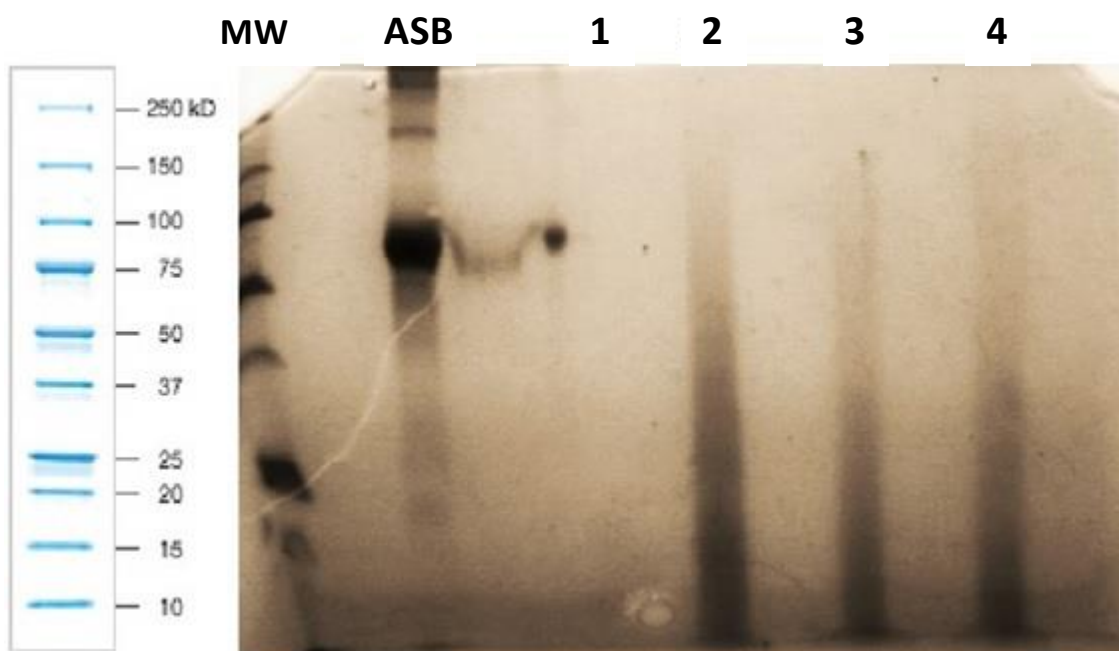


Figura 22 - SDS-PAGE Tris-Glicina das diferentes colas usando ASB com padrão interno. Pesos moleculares standard (MW) foram usados como referência. 1- Cola 1; 2- Cola 2; 3- Cola 3, 4- Cola 4.

Por se observar um arrastamento ao longo do gel das colas pelo método Tris-Glicina decidiu-se realizar um outro método de separação de proteínas e péptidos de baixo peso molecular, Tris-Tricina. Ao usar este método pretendia-se diferenciar

melhor as proteínas contidas nas amostras das colas usadas e quais os seus pesos moleculares.

Como se observa na Figura 23, ocorreu uma fraca separação do conteúdo em proteínas das colas mas as bandas com maior tamanho e intensidade encontram-se entre 15 e 50 kDa.

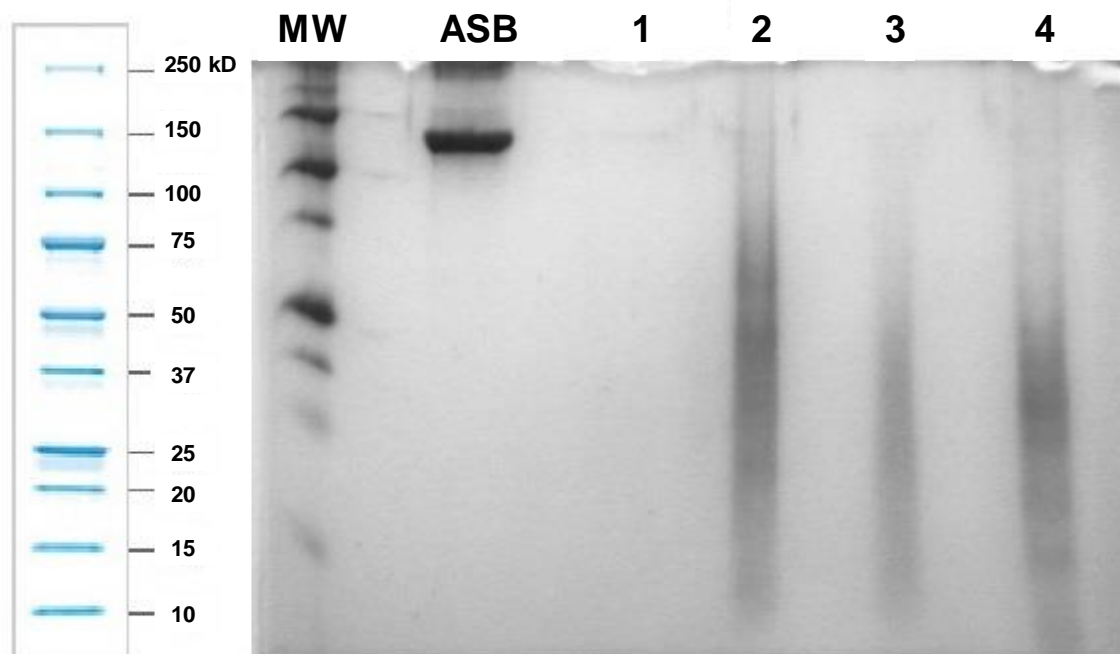


Figura 23 - SDS-PAGE Tris-Tricina das diferentes colas usando ASB com padrão interno
Pesos moleculares standard (MW) foram usados como referência. 1- Cola 1; 2- Cola 2; 3- Cola 3, 4- Cola 4.

4. Análise da Cor

4.1 Intensidade Corante

A intensidade corante (IC) é um indicador muito importante em enologia e especialmente na vinificação de vinho do Porto uma vez que a categoria atribuída ao produto é intimamente relacionada com a cor. Será de esperar que os pigmentos poliméricos tenham um maior efeito na cor dos vinhos mais velhos (Cheynier *et al.*, 2006).

A Figura 24 compara a intensidade corante dos dois vinhos controlo com os vinhos que passaram pelos diferentes processos de colagem. Neste gráfico é bem visível essa ação tecnológica sobre os vinhos relativamente à intensidade corante.

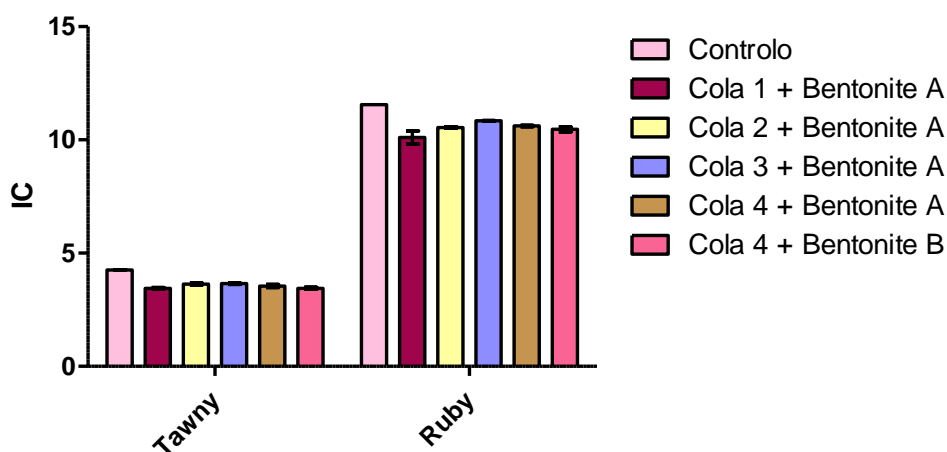


Figura 24 - Histograma de comparação da intensidade corante ($P < 0,05$). Anexos: Tabela A e Tabela B.

Como se pode observar no histograma, a intensidade corante do vinho Ruby é superior a intensidade corante do vinho Tawny como seria de esperar devido a influência do tipo de tecnologia usada no fabrico dos vinhos. Fenómenos que ocorrem durante o processo de envelhecimento, como envelhecimento oxidativo ou redutor, precipitação de compostos ou processos de copigmentação e/ ou auto-associação podem explicar as diferenças entre estas duas categorias e consequente intensidade corante dos vinhos controlo.

Em ambos os vinhos, a intensidade corante diminuí significativamente pela aplicação de todas as colas comerciais. Quando se comparam as amostras onde foi usada a mesma cola (cola 4) mas bentonites diferentes não se verificam diferenças relevantes logo as diferenças entre a composição das bentonites não influenciam significativamente a intensidade corante destes vinhos.

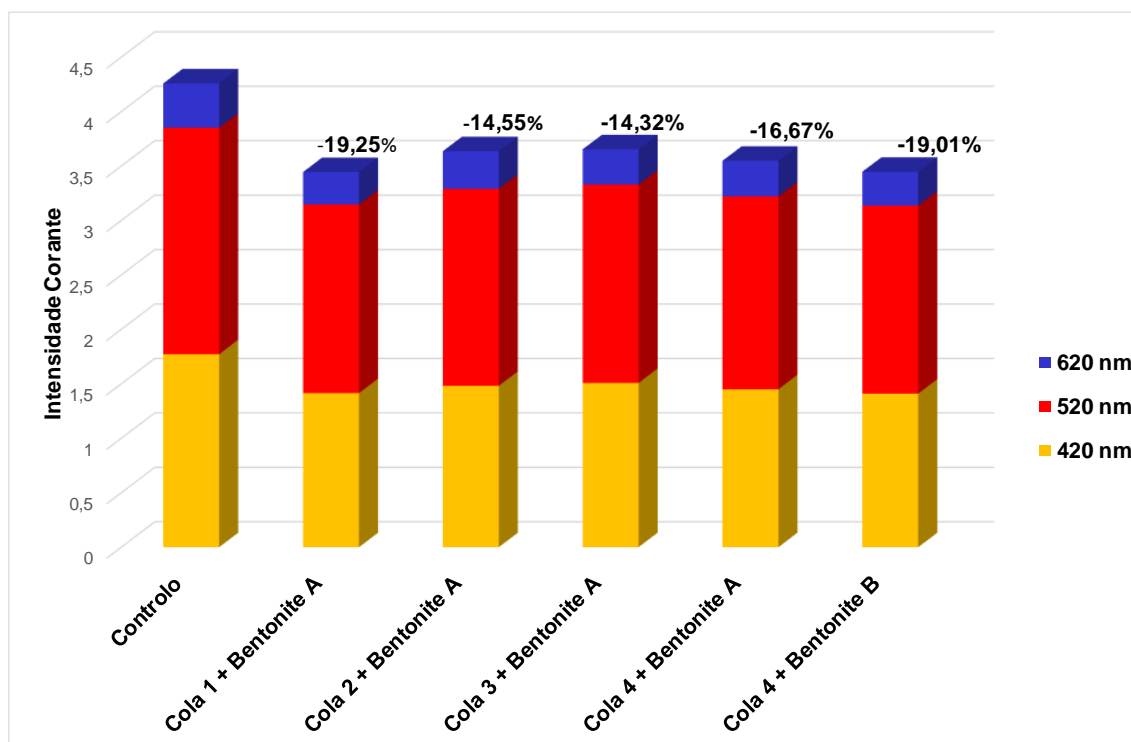


Figura 25 - Intensidade corante do vinho Tawny

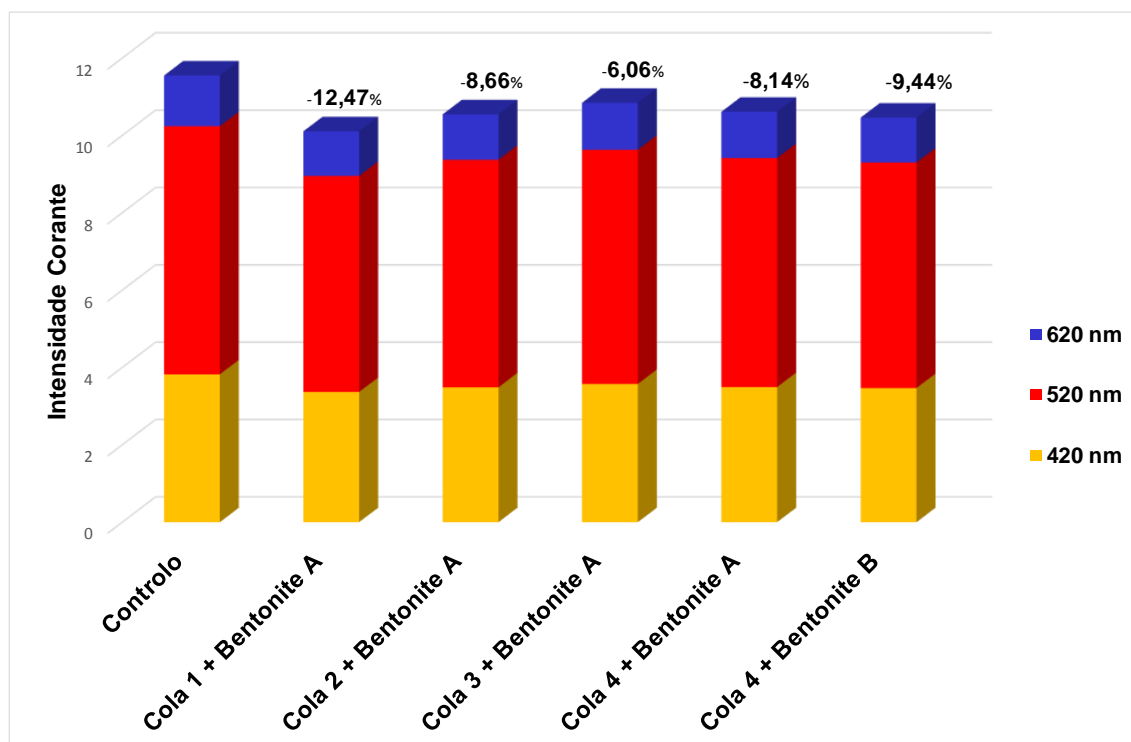


Figura 26 - Intensidade Corante do vinho Ruby

Mais detalhadamente pode-se ver a contribuição das absorvâncias 420 nm, 520 nm e 620 nm para a intensidade corante dos dois vinhos e o equilíbrio da cor azul, vermelha e amarela. Em ambos os vinhos a absorvância a 520 nm apresenta a maior contribuição para a intensidade corante podendo ser explicado pela presença de

antocianinas ou por pigmentos polimerizados resultantes de fenómenos que ocorrem durante a estabilização dos vinhos, sendo estes responsáveis pela cor vermelha das uvas e vinhos.

Verificou-se que o maior decréscimo de intensidade corante nos dois vinhos pela ação da cola 1 sendo de 19,25% para o Tawny e 12,47% para o Ruby. A cola 3, pelo contrário, induz a menor variação nos dois vinhos, 14,32% e 6,06% respetivamente.

4.2 Cielab

Este método consiste na medição e cálculo das características cromáticas do vinho derivados dos componentes tricromáticos: X, Y e Z, de acordo com a Commission Internationale de l'Eclairage (CIE, 1976), na tentativa de imitar as sensações de cor.

Os resultados dos valores médios obtidos para cada amostra estão reunidos no Quadro 6.

Quadro 6 - Características cromáticas dos dois vinhos do Porto em contacto com as diferentes colas comerciais

<i>Amostras</i>	<i>Vinho</i>	<i>L*</i>	<i>a*</i>	<i>b*</i>	<i>C*</i>	<i>h*</i>	<i>ΔC*</i>	<i>ΔH*</i>	<i>ΔE*</i>
Tawny	Controlo	77,2	23,4	11,13	25,89	25,80			
	Cola 1 + Bentonite A	80,6	20,5	9,05	22,39	23,72	-3,50	-3,09	4,94
	Cola 2 + Bentonite A	79,8	20,8	9,31	22,74	24,14	-3,15	-2,51	4,14
	Cola 3 + Bentonite A	79,5	21,1	9,33	23,07	23,85	-2,82	-2,67	3,76
	Cola 4 + Bentonite A	80,2	20,3	8,74	22,09	23,39	-3,81	-3,46	4,49
	Cola 4 + Bentonite B	81,1	20,1	8,56	21,82	23,08	-4,07	-3,79	5,75
Ruby	Controlo	91,4	8,8	0,27	8,84	1,77			
	Cola 1 + Bentonite A	92,8	7,5	-0,01	7,50	0,2	-1,35	-1,58	1,98
	Cola 2 + Bentonite A	92,4	8,1	0,04	8,08	0,3	-0,76	-1,15	1,25
	Cola 3 + Bentonite A	92,1	8,2	0,13	8,24	0,9	-0,60	-0,70	0,99
	Cola 4 + Bentonite A	93,7	7,7	1,07	7,80	7,9	-1,04	-0,06	2,66
	Cola 4 + Bentonite B	93,7	7,7	1,09	7,80	8,0	-1,04	0,03	2,71

De acordo com a análise do Quadro 6 podemos verificar a influência da colagem nos dois vinhos pela alteração das características cromáticas.

O parâmetro L^* (luminosidade) permite avaliar a intensidade da cor e em todos os vinhos colados apresenta um valor médio maior que pode ser explicado pelo arrastamento de compostos que causam turbidez. Estes valores obtidos vão de encontro ao objetivo pretendido na realização deste processo de estabilização, ou seja, a clarificação dos vinhos tornando-os mais luminosos.

Correspondendo os valores de $a^*>0$ às componentes de cor vermelha, constata-se que o Tawny apresenta maiores valores médios de a^* em relação ao Ruby, enquanto os valores de $b^*>0$ (componentes de cor amarela) são superiores no Tawny. Relativamente a estes parâmetros observa-se a influência do tipo de envelhecimento nomeadamente no Tawny pelos valores da componente b^* mais desviados para a tonalidade amarela. Estes resultados devem-se a fenómenos oxidativos que ocorrem ao longo da produção destes vinhos. Quando comparado com os valores da absorvância a 420 nm podemos observar uma maior contribuição em proporção dos compostos de tonalidade amarela para a intensidade corante do Tawny. O aumento dos valores de L^* (luminosidade) e a diminuição dos valores de a^* (cor vermelha) estão de acordo com outros estudos reportados anteriormente (Gil-Munoz *et al.*, 1997; Cosme *et al.*, 2007).

O parâmetro C^* (cromaticidade) permite caraterizar a concentração ou saturação da cor global e o parâmetro h^* (tonalidade) permite avaliar o tom de cor. Quanto maior for o valor de h^* , mais a tonalidade da cor estará deslocada no sentido da cor amarela. Novamente pode se dizer que o vinho Tawny apresenta um maior valor de h^* confirma a influência da oxidação. A cor caraterística dos vinhos da categoria Tawny deve-se a pigmentos como a vitisina A que fazem mudar a cor para o laranja (Mateus and de Freitas, 2001).

Para avaliar as diferenças cromáticas entre os vinhos analisou-se o parâmetro ΔE^* verificando-se uma maior influência da colagem no Tawny em comparação com o Ruby.

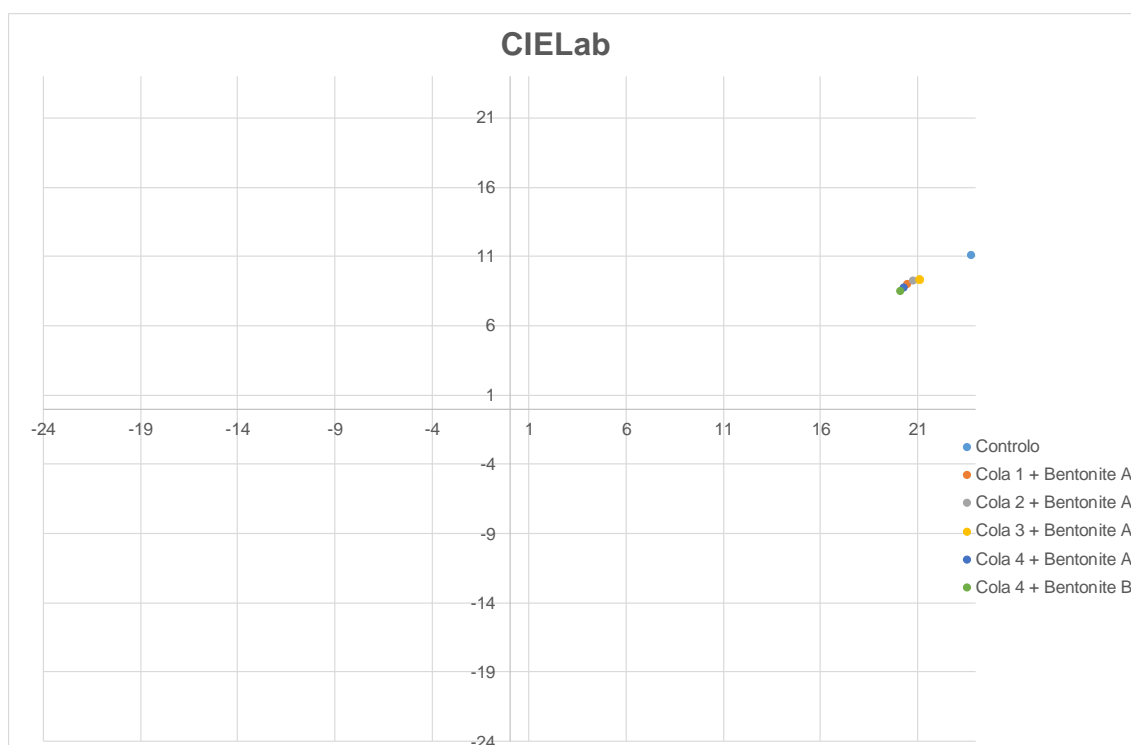


Figura 27 - Gráfico correspondente aos parâmetros a^* e b^* do vinho Tawny

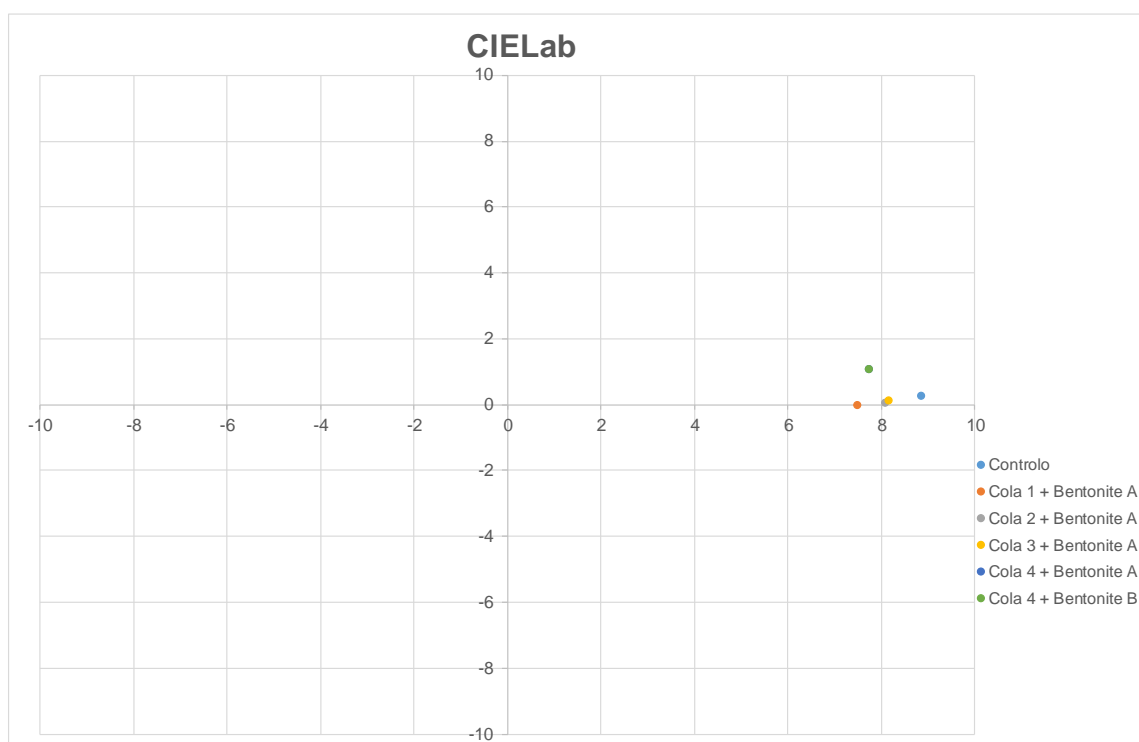


Figura 28 - Gráfico correspondente aos parâmetros a^* e b^* do vinho Ruby

Pela análise dos gráficos a cima podemos observar a clara influência da colagem nos dois vinhos (Figura 27 e Figura 28). No entanto, parece que o efeito das diferentes colas tem um comportamento mais diferenciado no caso do vinho Ruby do que no vinho Tawny uma vez que os vinhos Ruby apresentam valores de a^* e b^* distintos e mais distantes entre si do que no caso vinho Tawny (Figura 27 e Figura 28).

4.3 Análise das antocianinas

4.3.1 Antocianinas Livres Totais

As antocianinas livres são os compostos que contribuem maioritariamente para a cor vermelha dos vinhos jovens. Devido a estabilização e envelhecimento, as antocianinas sofrem processos de auto-associação e copigmentação com outros fenóis dão origem a pigmentos mais estáveis (pigmentos polimerizados) (Glories, 1984; Cheynier *et al.*, 2006; Fulcrand *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos através do método do bissulfito pela comparação dos vinhos controlo com os vinhos que sofreram colagem são os apresentados na Figura 29.

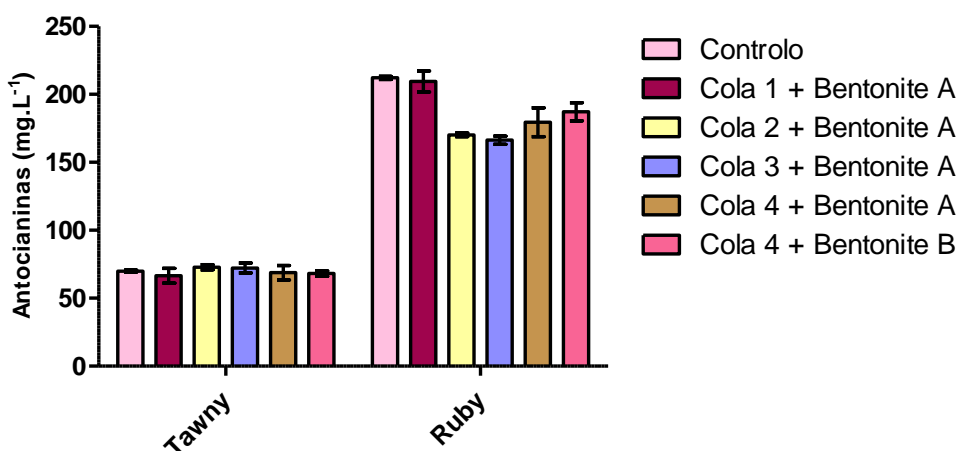


Figura 29 - Histograma representativo das antocianinas livre totais ($P < 0,05$). Anexos: Tabela C e Tabela D.

Verifica-se que o Ruby possui maior quantidade de antocianinas livres em relação ao Tawny tal como era esperado para as duas categorias de vinhos.

Após aplicação das colas no Tawny não ocorreram diferenças significativas na quantidade de antocianinas livres totais quando comparado com o vinho controlo. A partir deste resultado pode concluir-se que as colas aplicadas não atuaram ao nível das antocianinas livres e que a perda de cor que se observou na diminuição da intensidade corante se pode dever a uma perda de matéria corante polimérica (Figura 25).

No Ruby podemos verificar que apenas a cola 1 não apresenta diferenças significativas em comparação com o vinho controlo. A diminuição do teor de antocianinas é acompanhada por uma redução do índice de cor vermelha como se verificou na análise da intensidade corante (Figura 26). A comparação do efeito das colas proteicas nos dois tipos de vinhos leva-nos a crer que as colas atuam preferencialmente em matéria corante polimerizada e que na falta dela, atuam nas antocianinas livres uma vez que o grau de polimerização dos pigmentos é superior num Tawny do que num Ruby.

Os resultados levam a querer que a ação de colas mais hidrolisadas, como o caso da cola 3 (gelatina altamente hidrolisada), diminui a quantidade de antocianinas monoméricas quando comparado com colas menos hidrolisadas. Esses efeitos são concordantes com outros estudos realizados (Cosme *et al.*, 2007).

Sendo as antocianinas compostos que se dissolvem em água logo as colas mais hidrolisadas retiram uma maior quantidade destes compostos. Apesar de a cola 3 retirar mais antocianinas livres apresenta uma maior intensidade corante, nomeadamente uma maior absorvância a 520 nm, logo podemos concluir que a cor destes vinhos não depende da quantidade de antocianinas livres mas sim de compostos polimerizados.

Relativamente à bentonite, sendo esta uma argila carregada negativamente, remove as proteínas por adsorção electrostática (Pocock *et al.*, 2011). Efeitos adicionais teóricos incluem interação electrostática com todos os compostos com carga positiva ao pH do vinho como é o caso das antocianinas (Chagas *et al.*, 2012). Apesar de terem sido usadas dois tipos de bentonite, não podemos observar diferenças significativas na sua aplicação. Para isso teríamos de testar diferentes concentrações desta argila e assim avaliar a influência desta cola mineral.

4.3.2 Quantificação de antocianinas por HPLC

A quantificação das antocianinas foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) obtendo-se cromatogramas ao comprimento de onda a que as antocianinas absorvem – 520 nm. Para representação do perfil antociânico dos dois vinhos, decidiu-se apresentar os respetivos cromatogramas (Figura 30 e Figura 31) das duas categorias de vinho do Porto.

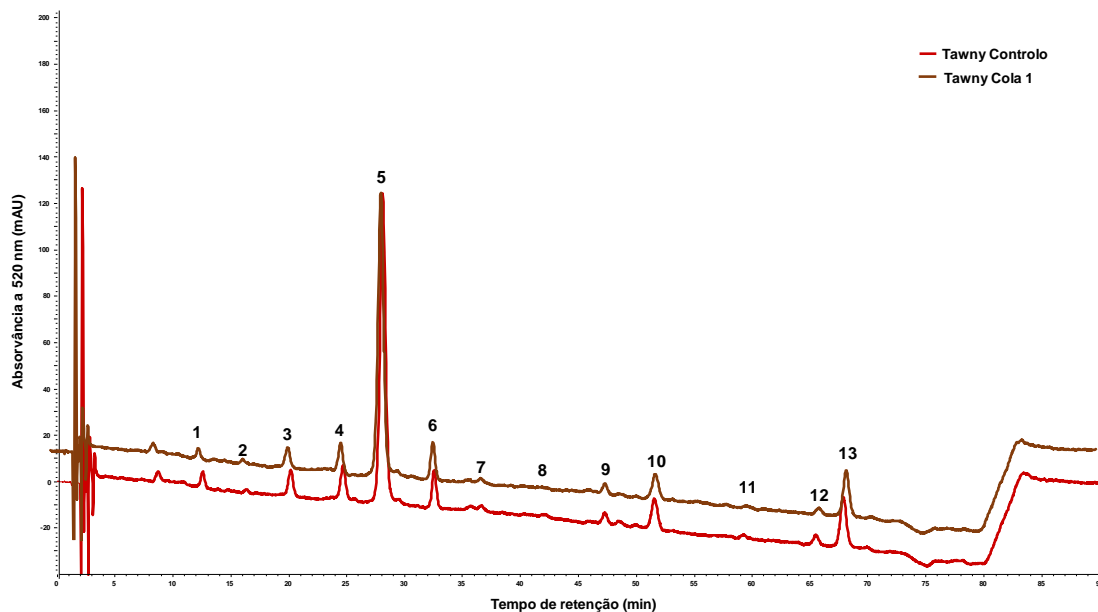


Figura 30 - Cromatograma do perfil das antocianinas do vinho Tawny.

Legenda:

- | | |
|------------------------------------|--|
| 1. 3-glucósido de delphinidina; | 8. 3-acetilglucósido de petunidina; |
| 2. 3-glucósido de cianidina; | 9. 3-cumaroíglucósido de delphinidina; |
| 3. 3-glucósido de petunidina; | 10. 3-acetilglucósido de malvidina; |
| 4. 3-glucósido de peonidina; | 11. 3-cumaroíglucósido de petunidina; |
| 5. 3-glucósido de malvidina; | 12. 3-cumaroíglucósido de peonidina; |
| 6. derivado pirúvico da malvidina; | 13. 3-cumaroíglucósido de malvidina. |
| 7. 3-acetilglucósido de cianidina | |

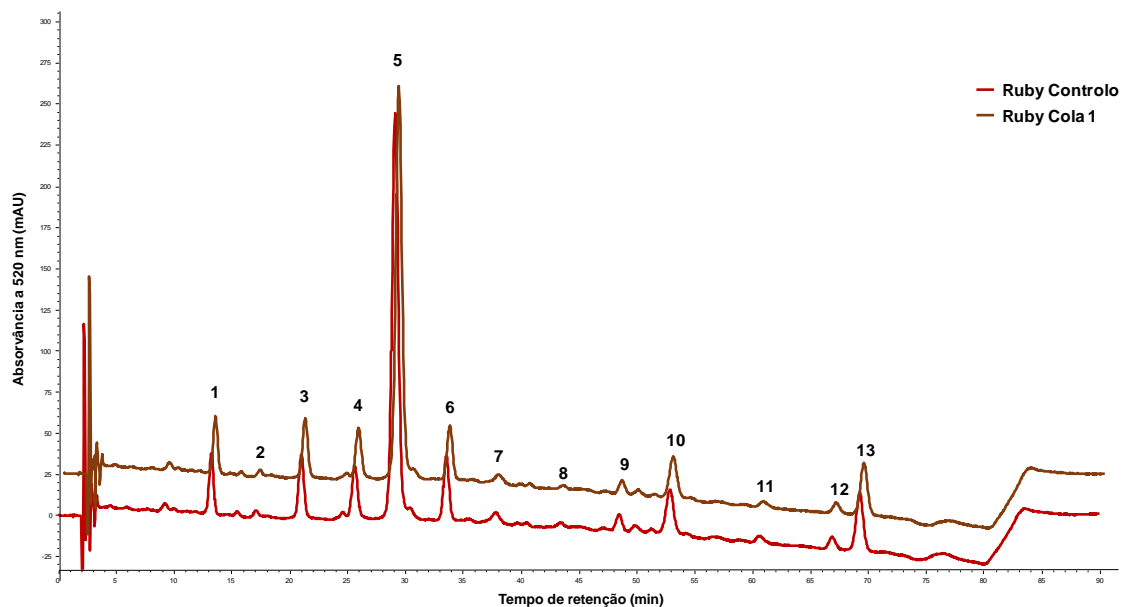


Figura 31 - Cromatograma do perfil das antocianinas do vinho Ruby.

Legenda:

1. 3-glucósido de delfinidina;
2. 3-glucósido de cianidina;
3. 3-glucósido de petunidina;
4. 3-glucósido de peonidina;
5. 3-glucósido de malvidina;
6. derivado pirúvico da malvidina;
7. 3-acetilglucósido de cianidina;
8. 3-acetilglucósido de petunidina;
9. 3-cumaroílgucósido de delfinidina;
10. 3-acetilglucósido de malvidina;
11. 3-cumaroílgucósido de petunidina;
12. 3-cumaroílgucósido de peonidina;
13. 3-cumaroílgucósido de malvidina.

Nos vinhos sem tratamento a percentagem dos diferentes tipos de antocianinas está relacionada com a idade dos vinhos (Cheynier *et al.*, 2006; Fulcrand *et al.*, 2006). Sendo estes vinhos envelhecidos, o perfil antociânico destes vinhos apresenta menor quantidade de antocianinas livres que quando comparado com um vinho jovem.

Comparando os dois vinhos com diferentes colagens na Figura 32 podemos também observar perfis diferentes pelas percentagens superiores de antocianinas livres no Ruby, como seria de esperar.

Em qualquer das amostras estudadas, as antocianinas monoglucosiladas aparecem com teores mais elevados. Quantitativamente o grupo das antocianinas cumariladas é superior ao grupo das antocianinas acetiladas.

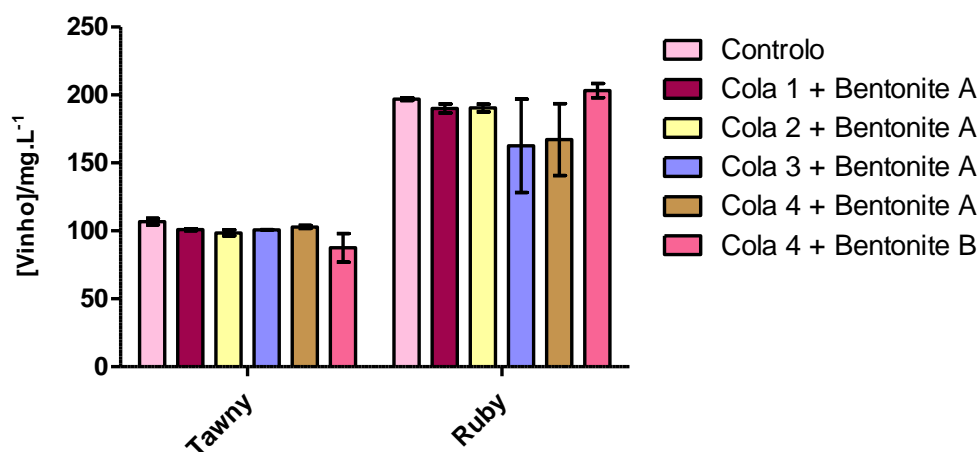


Figura 32 - Histograma das antocianinas monoméricas ($P < 0,05$). Anexos: Tabela E.

4.4 Índice de Fenóis Totais

Os resultados referentes ao Índice de Fenóis Totais estão representados na Figura 33 pela medição da absorvância a 280 nm comparando os vinhos controlo com a respetivas colagens.

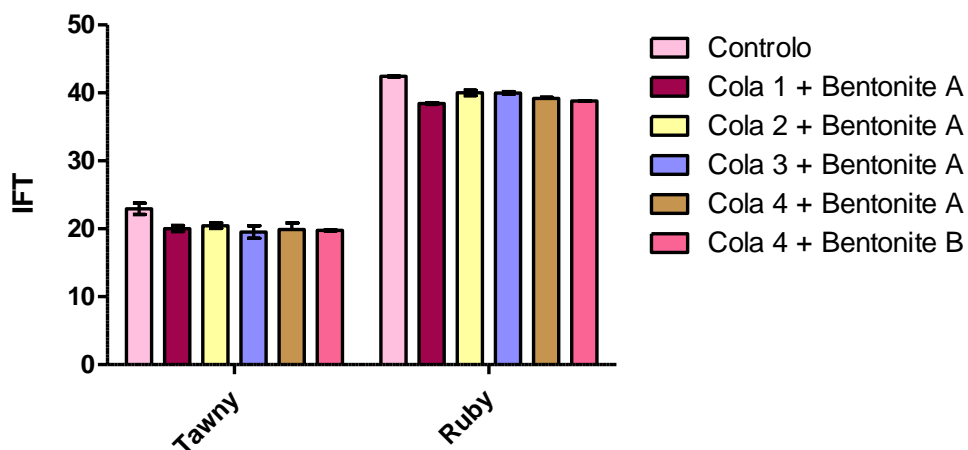


Figura 33 - Histograma do índice de fenóis totais ($P < 0,05$). Anexos: Tabela F e Tabela G.

Pela observação inicial do histograma, podemos verificar claras diferenças entre as duas gamas de vinho do Porto. Como seria de esperar, podemos observar que o Ruby apresenta maior índice de fenóis totais que o Tawny uma vez que na vinificação de Vinho do Porto Ruby se procura uma maior extração.

Em ambos os casos podemos também observar uma diminuição significativa do índice de fenóis totais na aplicação das colas em relação ao controlo. Em ambos os casos verifica-se que, na aplicação da cola 2, foram removidos menos fenóis totais que nas restantes colas.

4.5 Taninos proantociânicos totais

Na Figura 34 estão representados os valores médios de Taninos Proantociânicos Totais obtidos em cada amostra comparando os vinhos controlo e respetivos tratamentos.

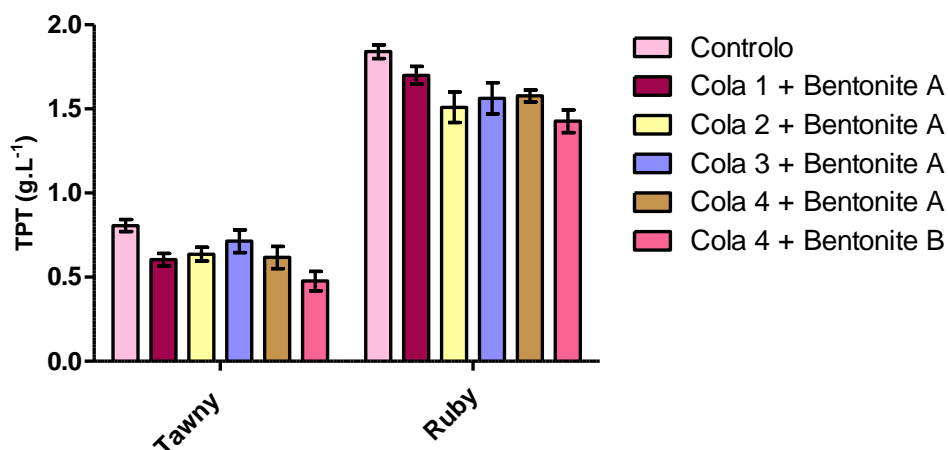


Figura 34 - Histograma dos valores médios de taninos proantociânicos totais (g.L^{-1}) ($P < 0,05$). Anexos: Tabela H e Tabela I.

Para ambas as amostras de vinhos verifica-se a influência da colagem quando comparadas com o vinho controlo como seria de esperar na aplicação deste tipo de tratamento.

Podemos concluir que a aplicação da bentonite B retira mais taninos proantociânicos totais quando comparada a amostra cola 4 com a bentonite A. A utilização desta cola mineral poderá ser uma boa opção quando se pretende reduzir a adstringência aos vinhos.

4.6 Índice de Diálise

O índice de diálise (I.D) permite avaliar a complexidade estrutural dos compostos fenólicos presentes num vinho. Os resultados obtidos para cada amostra são apresentados na Figura 35.

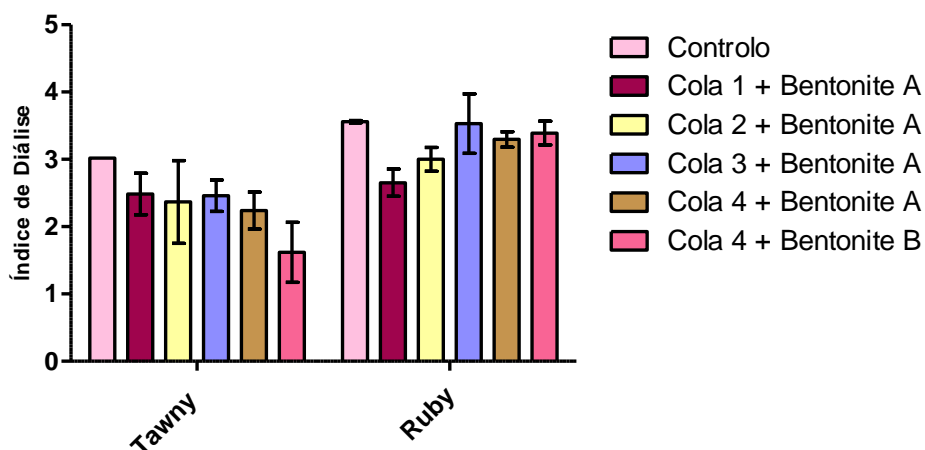


Figura 35 - Histograma dos valores médios do índice de diálise ($P < 0,05$). Anexos: Tabela J e Tabela K.

O Ruby apresenta um índice de diálise superior ao Tawny o que indica que este vinho é estruturalmente mais complexo devido a conter compostos mais polimerizados. No entanto, esta diferença não é assim tão grande como se tem observado para os outros parâmetros até agora discutidos.

De acordo com a análise estatística realizada através da análise de variância a um fator (ANOVA), seguido pelo teste de Bonferroni para comparação entre os grupos indica que existe diferenças significativas comparando o Controlo da amostra de Tawny com a aplicação da cola 2, cola 4 e cola 4 + bentonite B, enquanto que no Ruby apenas se verificaram diferenças significativas na aplicação da cola 1.

Sendo a estabilização do vinho e preservação das propriedades da cor ao longo do tempo o fator mais determinante na escolha do tipo de cola, comparou-se esta análise a outras determinadas anteriormente, como o caso da determinação da intensidade corante, de forma a verificarmos qual adjuvante traria maiores benefícios/rendimento no tratamento destes vinhos.

Tomando do princípio que compostos mais polimerizados são mais estáveis (Michaud *et al.*, 1971; Czochanska *et al.*, 1979; Lee and Jaworski, 1989; Prieur *et al.*, 1994; De Freitas, 1995; Dallas *et al.*, 1996; Moutounet *et al.*, 1996) e que contribuem para intensidade corante do vinho a aplicação da cola 3 no vinho Tawny é a mais adequada por arrastar menos compostos e por ter a menor percentagem de perda de cor. Para além disso, é a cola que forma menor quantidade de borra tendo assim menos perdas de vinho após este tratamento. De igual forma, a cola 3 apresenta a mesma influência na amostra de vinho Ruby.

4.7 Poder Tanante

Este teste permite verificar a capacidade dos taninos dos vinhos de interagirem com as proteínas formando complexos insolúveis. Esta propriedade dos taninos está na origem da sensação da adstringência. A determinação da capacidade tanante dos taninos na matriz dos dois vinhos em comparação com os diferentes tratamentos é apresentada na Figura 36.

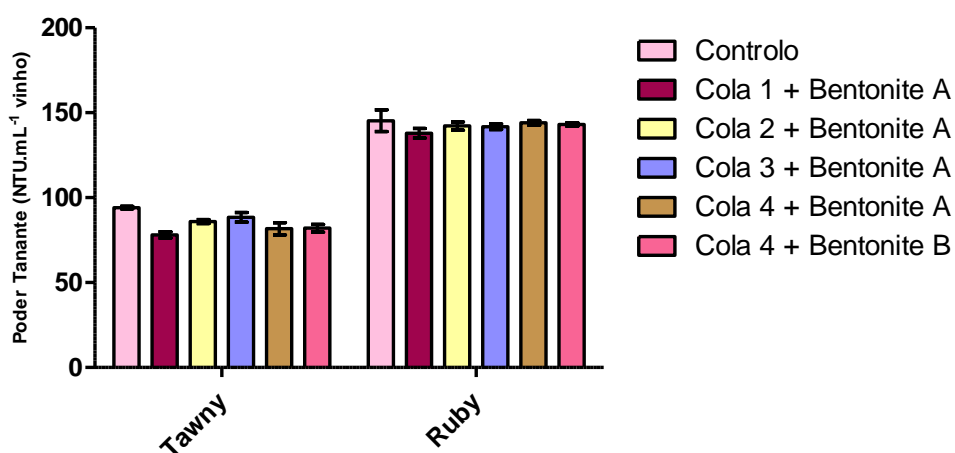


Figura 36 - Histograma de comparação dos valores médios do poder tanante (NTU.mL^{-1} vinho) ($P < 0,05$). Anexos: Tabela L e Tabela M.

De acordo com o obtido podemos concluir que existem diferenças significativas na aplicação das diferentes colas proteicas no vinho Tawny. No caso do Ruby apenas na aplicação da cola 1 se verificam diferenças.

Vários autores afirmam que a elevada polimerização das estruturas de procianidinas ($\text{DP} > 12$), ou seja, as estruturas de taninos condensados mais polimerizados, apresentam uma menor flexibilidade, traduzindo-se numa maior dificuldade de se ligarem às proteínas, embora sejam capazes de estabelecer ligações com ela, e daí um menor valor de poder tanante resultante (Sarni-Manchado *et al.*, 1999).

Desta forma, a reduzida influência da ASB nas amostras é traduzida pelos resultados apresentados, uma vez que se tratam de amostras de vinho mais envelhecidas e que apresentam compostos mais polimerizados.

Quando comparados estes resultados aos da determinação dos taninos proantociânicos totais podemos afirmar que a ação das colas sobre o vinho foi preferencial sobre os flavan-3-óis monoméricos.

4.8 Análise dos flavan-3-óis

Estão representados na Figura 37 e Figura 38 os cromatogramas obtidos pela análise das catequinas e procianidinas diméricas presentes nas amostras de vinho. Decidiu-se apenas representar o perfil cromatográfico dos dois vinhos e um com a aplicação de uma das colas, cola 4, da 1ª fração visto termos obtido cromatogramas da 2ª fração com picos muito pequenos. Observa-se a partir destes cromatogramas que apenas foi identificado um pico na 1ª fração, a (-)-epicatequina. Foi injetada uma quantidade superior a que é descrita no método, uma vez que foi utilizado o dobro da quantidade para recuperar o resíduo obtido por cromatografia líquida e desta forma conseguimos obter picos visíveis no cromatograma de HPLC.

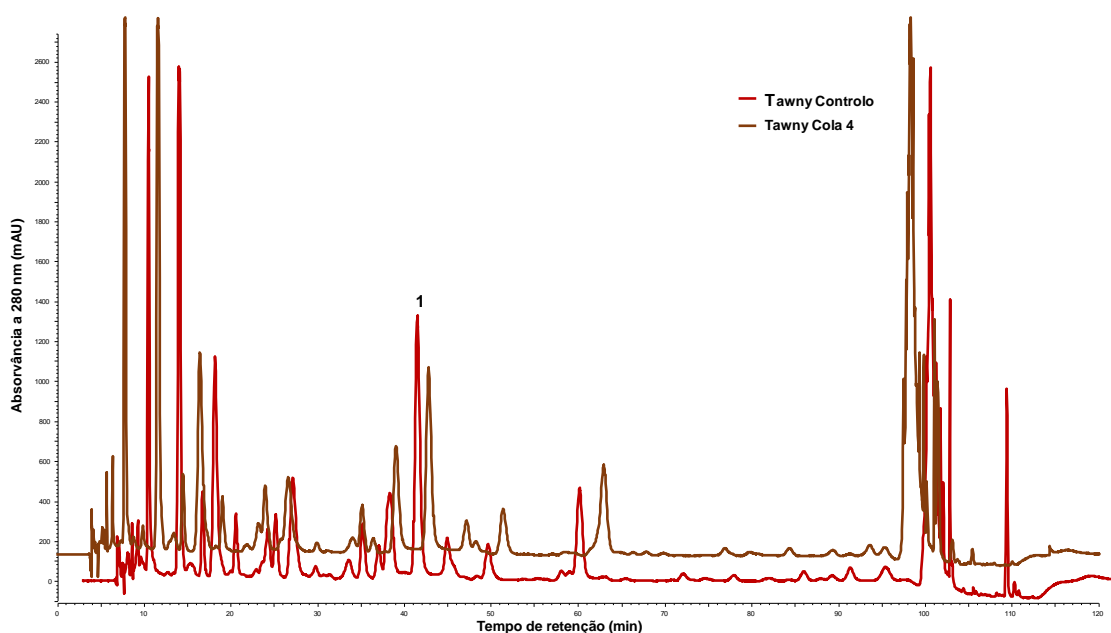


Figura 37 - Cromatograma de HPLC da 1ª fração do vinho Tawny (Controlo e Cola 4)

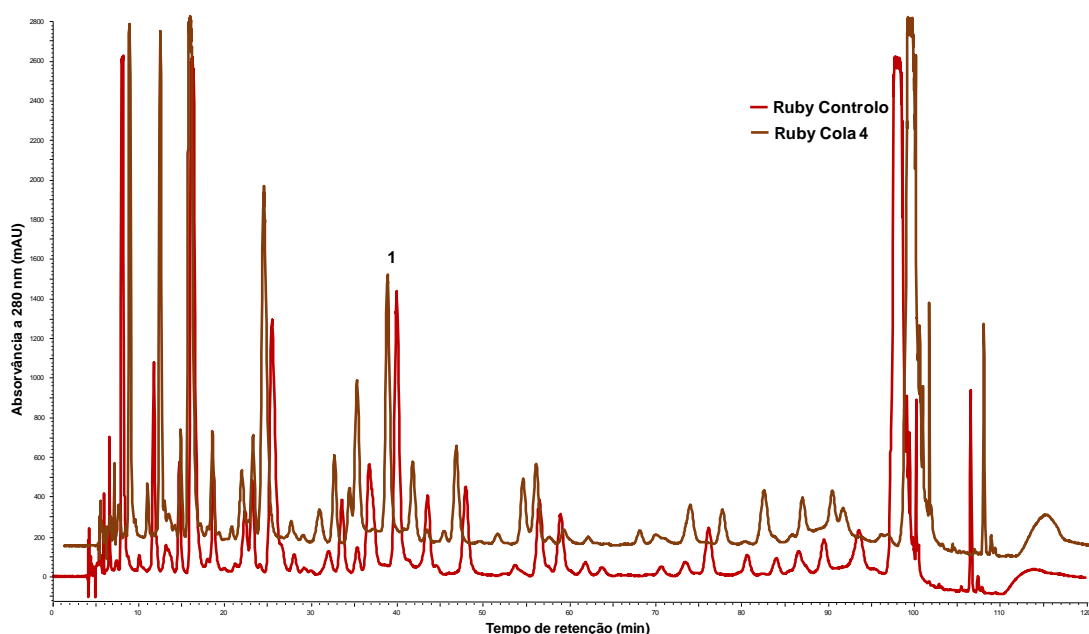


Figura 38 - Cromatograma de HPLC da 1ª fração do vinho Ruby (Controlo e Cola 4)

A aplicação de gelatina como agente clarificante no vinho levou a uma diminuição significativa na quantidade de procianidinas nos vinhos e está de acordo com outros estudos realizados (Versari *et al.*, 1998; Sarni-Manchado *et al.*, 1999; Cosme *et al.*, 2009; Oberholster *et al.*, 2013).

A análise das procianidinas é particularmente complexa devido à sua estrutura. O método utilizado apenas permite a deteção e quantificação de procianidinas diméricas e algumas triméricas. Será de esperar que a gelatina arraste as procianidinas com grau de polimerização mais elevado e esterificadas com o ácido gálico (Ricardo da Silva *et al.*, 1991c) sendo estes compostos os que mais contribuem para a adstringência dos vinhos (Lea and Arnold, 1978) e daí que o índice de taninos proantocianicos totais tenha diminuído com a aplicação das colas proteicas como é apresentado na Figura 34.

Através análise dos resultados (Figura 39) podemos observar a influência das gelatinas proteicas nas procianidinas identificadas. Estes resultados permitem prever que o efeito das colas proteicas é preferencial para procianidinas mais polimerizadas.

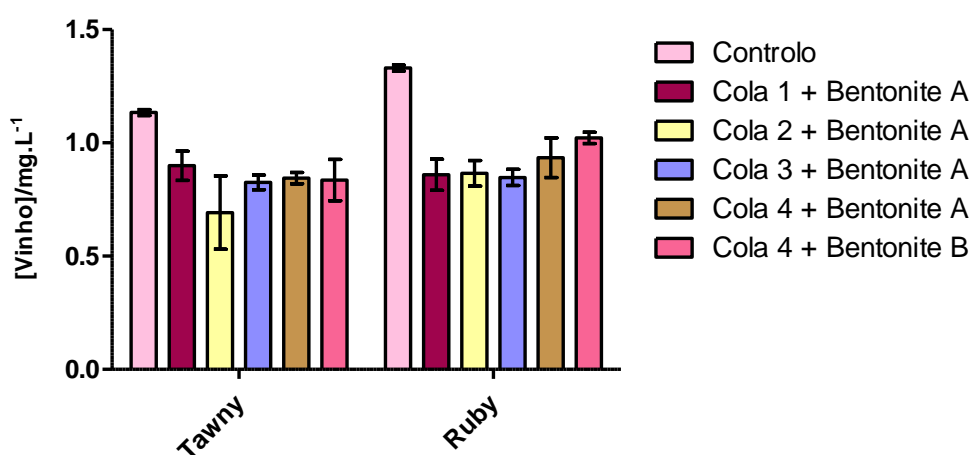


Figura 39 - Histograma de quantificação de procianidinas ($P < 0,05$). Anexos: Tabela N.

Tendo em conta a diversidade de gelatinas proteicas existentes no mercado, o efeito deste agente depende das características do produto nomeadamente do grau de hidrólise das mesmas (Sarni-Manchado *et al.*, 1999; Maury *et al.*, 2001; Cosme *et al.*, 2009). Em comparação com o efeito no arrastamento de compostos responsáveis pela cor como as antocianinas, é mais notória a ação das gelatinas líquidas sob as procianidinas.

4.9 Índice de Folin-Ciocalteu

Na Figura 40 estão representados os resultados obtidos na avaliação do Índice de Folin-Ciocalteu dos vinhos e respectivas colas aplicadas.

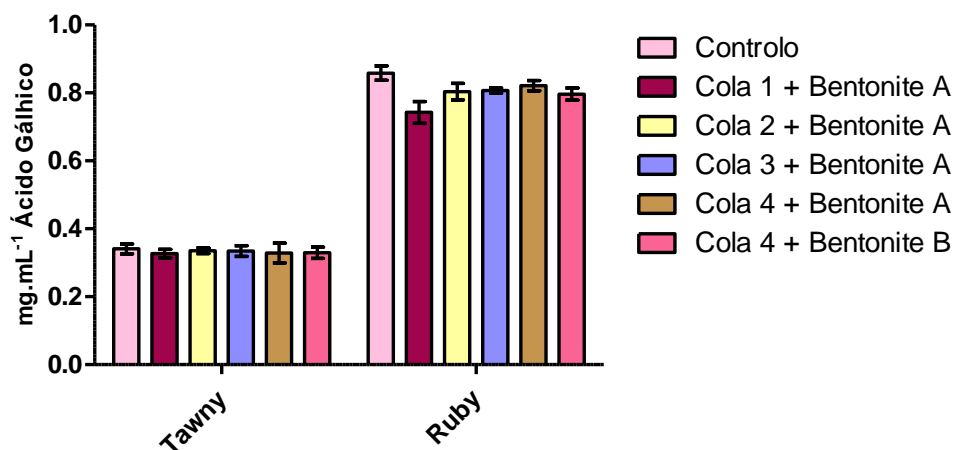


Figura 40 - Histograma do índice de Folin-Ciocalteu ($P < 0,05$). Anexos: Tabela O e Tabela P.

O doseamento dos fenóis totais por este método baseia-se na capacidade que os compostos fenólicos possuem de reduzir a mistura dos ácidos fosfotungstínicos e fosfomolibdicos, em meio alcalino.

Os resultados obtidos são semelhantes ao determinado no doseamento de fenóis totais pela medição da absorvância a 280 nm que mostra um efeito mais evidenciado (diminuição) no caso do vinho Ruby com a aplicação das diferentes colas proteicas comerciais.

4.10 Análise das propriedades antioxidantes

Os compostos fenólicos têm a capacidade de prevenir a oxidação graças à sua capacidade de capturar, desativar ou reparar os danos causados pelos radicais livres que estão implicados no desenvolvimento de diversas doenças.

Processos como a maceração pelicular, maceração carbónica, microoxigenação e envelhecimento em barricas de madeira contribuem significativamente para um aumento da capacidade antioxidante dos vinhos (Alañón *et al.*, 2011).

De modo a estudar as propriedades antioxidantes dos vinhos procedeu-se à utilização do radical livre estável DPPH para avaliar a capacidade antiradicalar (capacidade de sequestrar radicais livres) e procedeu-se à utilização do método FRAP para avaliar o poder redutor.

4.10.1 Capacidade antiradicalar (DPPH)

Os resultados obtidos na avaliação da capacidade antiradicalar dos vinhos estão representados na Figura 41.

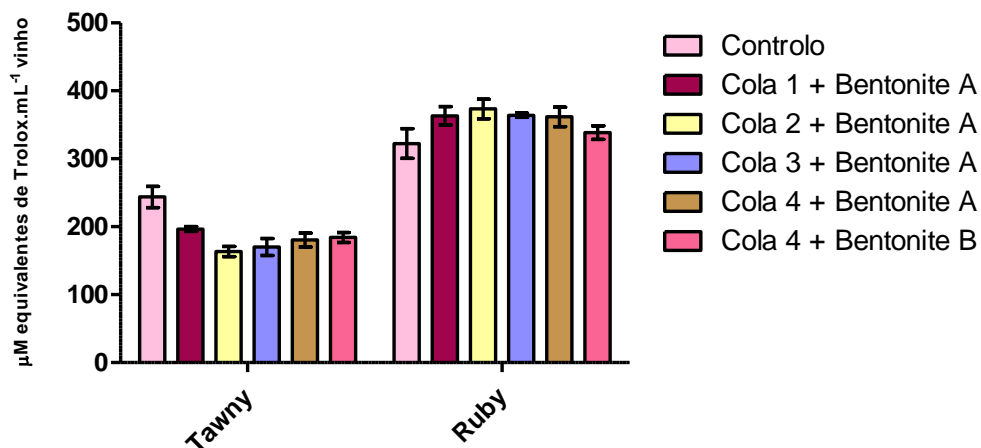


Figura 41 - Histograma da capacidade antiradicalar ($P < 0,05$). Anexos: Tabela Q e Tabela R.

A capacidade antiradicalar dos vinhos está diretamente relacionada com a sua composição polifenólica. Quanto maior a quantidade de compostos polifenólicos, sendo estes antioxidantes naturais, menor a concentração do radical livre DPPH.

Seria de esperar que os resultados, expressos em μM equivalentes de Trolox. mL^{-1} , fossem superiores no vinho Ruby e consequentemente superiores na amostra controle uma vez que, quando comparado com o índice de fenóis totais, apresentam quantidade superior de fenóis totais. Associamos este resultado a um erro de execução do método analítico, pois não se encontra mais nenhuma explicação válida para explicar o seu comportamento.

Relativamente ao vinho Tawny, podemos concluir que o processo de colagem, influencia a sua capacidade antiradicalar pois os vinhos, após este tratamento, apresentam valores significativamente inferiores ao vinho controle.

4.10.2 Avaliação do poder redutor - FRAP

Os resultados obtidos na avaliação do poder redutor dos vinhos estão representados na Figura 42.

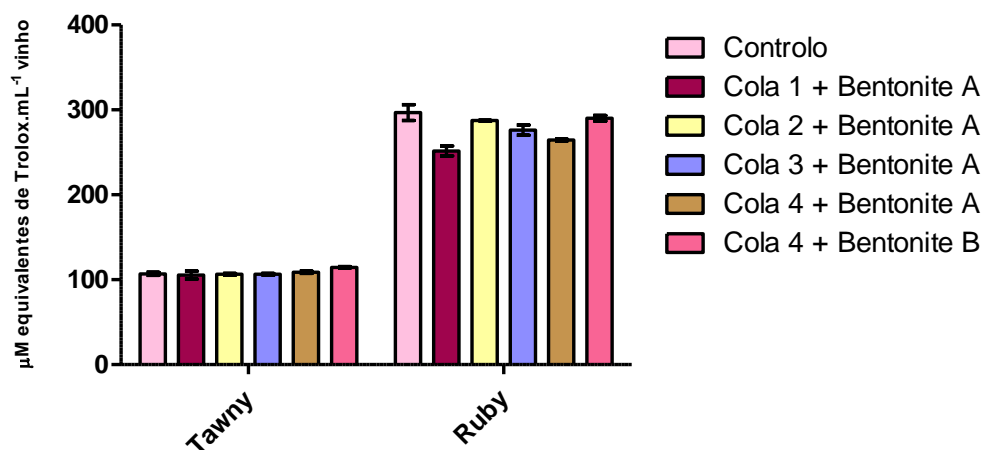


Figura 42 - Histograma do poder redutor ($P < 0,05$). Anexos: Tabela S e Tabela T.

Este método espectrofotométrico mede a capacidade de reduzir o ferro presente no complexo tripiridiltriazina férrica pelos antioxidantes. O aumento da complexidade estrutural dos vinhos reflete-se na perda gradual de capacidade de complexação de iões metálicos (de Gaulejac et al., 1999).

Pela análise dos resultados não se observam diferenças significativas entre o controlo do vinho Tawny e as amostras que sofreram colagem.

No Ruby, apenas a amostra em que foi aplicada a cola 4 e a bentonite B não se observam diferenças significativas podendo-se concluir que a aplicação retira menor quantidade de estruturas polimerizadas. Por comparação com os resultados obtidos pela análise das procianidinas podemos especular que este tratamento retira menor quantidade das procianidinas diméricas identificadas nas amostras.

Conclusões

Como todos os estudos realizados em vinhos, reunir todos os fatores envolvidos na vinificação e evolução da complexidade química é muito difícil especialmente quando se trata de uma técnica como a colagem em que os efeitos variam dependendo do tipo de cola, dose de aplicação e idade do vinho (Stankovic *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos nas duas categorias dos vinhos podem ser explicados pela composição polifenólica diferente. Tendo duas amostras de vinho de categoria diferente, a ação das colas nos compostos fenólicos afetou diferenciadamente as diferentes frações. Dessa forma, é necessário ter em conta o estilo de vinho a produzir avaliando a sua composição de forma a se aplicar a melhor cola. De acordo com os resultados também obtidos noutros estudos (Gonzalez-Neves *et al.*, 2014) a polaridade e a natureza hidrofílica ou hidrofóbica das colas define a sua capacidade de reter ou adsorver antocianinas ou outros fenóis.

Podemos concluir que existe uma ação mais acentuada sobre as procianidinas do vinho confirmando um dos propósitos de elaboração deste processo de estabilização, amaciar o vinho.

Relativamente ao efeito sob a matéria corante, a gelatina líquida mais hidrolisada arrasta maior quantidade de antocianinas monoméricas contribuindo para uma menor intensidade corante dos vinhos.

Para determinar o tratamento indicado para clarificação e estabilização dos vinhos é necessário realizar testes de colagem prévios permitindo uma previsão dos resultados e uma melhor escolha na cola e dose respetiva a utilizar.

Bibliografia

Alañón, M. E., Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., Gordon, M. H., Pérez-Coello, M. S. A study of the antioxidant capacity of oak wood used in wine ageing and the correlation with polyphenol composition. *Food Chemistry* **2011**, 128, 997-1002;

Allen, M. Advanced Oenology. Charles Sturt University **1994**,

Arnold, R. A., Noble, A. C., Singleton, V. L. Bitterness and Astringency of Phenolic Fractions in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1980**, 28, 675-678;

Asen, S., Stewart, R. N., Norris, K. H. Copigmentation of Anthocyanins in Plant-Tissues and Its Effect on Color. *Phytochemistry* **1972**, 11, 1139-&;

Barquette, B., Trione, D. Les Tanins. *Actas do 4º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo* **1998**, Vol II, 255-261;

Bate-Smith, E. C. Adstringency in foods. *Food* **1954a**, 23, 124;

Bate-Smith, E. C. Hemanalysis of Tannins - Concept of Relative Astringency. *Phytochemistry* **1973**, 12, 907-912;

Beart, J. E., Lilley, T. H., Haslam, E. Plant Polyphenols - Secondary Metabolism and Chemical Defense - Some Observations. *Phytochemistry* **1985**, 24, 33-38;

Benzie, I. F. F., Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* **1996**, 239, 70-76;

Bonafe, C. F. S., Villasboas, M., Suarez, M. C., Silva, J. L. Reassembly of a Large Multisubunit Protein Promoted by Nonprotein Factors - Effects of Calcium and Glycerol on the Association of Extracellular Hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry* **1991**, 266, 13210-13216;

Bondet, V., BrandWilliams, W., Berset, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH* free radical method. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **1997**, 30, 609-615;

Bourzeix, M., Weyland, D., Heredia, N. Étude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bull. de O.I.V.* **1986**, 669-670, 1175-1254;

Brouillard, R. Abstracts of Papers of the American Chemical Society. Chemical Structure of Anthocyanins Academic Press. **1982**,

Brouillard, R. The In vivo Expression of Anthocyanin Color in Plants. *Phytochemistry* **1983**, 22, 1311-1323;

Brouillard, R., Lang, J. The Hemiacetal-Cis-Chalcone Equilibrium of Malvin, a Natural Anthocyanin. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **1990**, 68, 755-761;

Catarino, S., Madeira, M., Monteiro, F., Rocha, F., Curvelo-Garcia, A. S., de Sousa, R. B. Effect of bentonite characteristics on the elemental composition of wine. *J Agric Food Chem* **2008**, 56, 158-165;

Chagas, R., Monteiro, S., Ferreira, R. Assessment of potential effects of common fining agents used for white wine protein stabilization. *American Journal of Enology and Viticulture* **2012**, 63(4), 574-578;

Cheynier, V., Duenas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J. M., Sarni-Manchado, P., Fulcrand, H. Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture* **2006**, 57, 298-305;

Clifford, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1999**, 79, 362-372;

Cosme, F., Ricardo-Da-Silva, J. M., Laureano, O. Effect of Various Proteins on Different Molecular Weight Proanthocyanidin Fractions of Red Wine during Wine Fining. *American Journal of Enology and Viticulture* **2009**, 60, 74-81;

Cosme, F., Ricardo-Da-Silva, J. M., Laureano, O. Protein fining agents: Characterization and red wine fining assays. *Italian Journal of Food Science* **2007**, 19, 39-56;

Czochanska, Z., Foo, L. Y., Porter, L. J. Compositional Changes in Lower Molecular-Weight Flavans during Grape Maturation. *Phytochemistry* **1979**, 18, 1819-1822;

Dallas, C., Laureano, O. Effects of Ph, Sulfur-Dioxide, Alcohol Content, Temperature and Storage Time on Color Composition of a Young Portuguese Red Table Wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1994**, 65, 477-485;

Dallas, C., Ricardo-da-Silva, J. M., Laureano, O. Products formed in model wine solutions involving anthocyanins, procyanidin B-2, and acetaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, 44, 2402-2407;

Dangles, O., Saito, N., Brouillard, R. Anthocyanin Intramolecular Copigment Effect. *Phytochemistry* **1993**, 34, 119-124;

Darias-Martin, J., Carrillo, M., Diaz, E., Boulton, R. B. Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments. *Food Chemistry* **2001**, 73, 217-220;

Darné, G. Recherches sur la composition en anthocyanes des grappes et des feuilles de vigne. PhD Thesis. University of Bourdeaux I, France, **1991**;

Davies, A. J., Mazza, G. Copigmentation of Simple and Acylated Anthocyanins with Colorless Phenolic-Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1993**, 41, 716-720;

De Freitas, V. Recherches sur les tanins condensés: application à l'étude des structures et propriétés des procyanidines du raisin et du vin. Université de Bourdeaux II, France, **1995**;

De Freitas, V. Recherches sur les tanins condensés: Application à l'étude des structures et propriétés des procyanidines oligomères du raisin et du vin. Thèse de Doctorat en Ampelologie et Oenologie. Université de Bourdeaux II, France, **1995**;

de Freitas, V., Glories, Y., Bourgeois, G., Vitry, C. Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry. *Phytochemistry* **1998**, 5, 1435-1441;

de Gaulejac, N. S.-C., Vivas, N., de Freitas, V., Bourgeois, G. The influence of various phenolic compounds on scavenging activity assessed by an enzymatic method. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1999**, 79, 1081-1090;

Dumon, M. C., Michaud, J., Masquelier, J. Dosages des procyanidols des pépins de raisin de cépages rouges et blancs du Bordelais. *Bull. de O.I.V.* **1991**, 725-726, 533-542;

Fernandes, I., Faria, A., Azevedo, J., Soares, S., Calhau, C., De Freitas, V., Mateus, N. Influence of Anthocyanins, Derivative Pigments and Other Catechol and Pyrogallol-Type Phenolics on Breast Cancer Cell Proliferation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58, 3785-3792;

Fulcrand, H., Duenas, M., Salas, E., Cheynier, V. Phenolic reactions during winemaking and aging. *American Journal of Enology and Viticulture* **2006**, 57, 289-297;

Fuleki, T., Ricardo-da-Silva, J. M. Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, 45, 1156-1160;

Geissman, T. A., Yoshimur, N. N. Synthetic Proanthocyanidin. *Tetrahedron Letters* **1966**, 2669-2792;

Gil-Munoz, R., Gomez-Plaza, E., Martinez, A., Lopez-Roca, J. M. Evolution of the CIELAB and other spectrophotometric parameters during wine fermentation. Influence of some pre and postfermentative factors. *Food Research International* **1997**, 30, 699-705;

Glories, Y. La couleur des vins rouges. *Connaissance de la Vigne et du Vin* **1984**, 18, 253-271;

Glories, Y. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. PhD Thesis. Université de Bordeaux II, France, **1978**;

Gonzalez-Neves, G., Favre, G., Gil, G. Effect of fining on the colour and pigment composition of young red wines. *Food Chemistry* **2014**, 157, 385-392;

Goto, T., Kondo, T. Structure and Molecular Stacking of Anthocyanins - Flower Color Variation. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1991**, 30, 17-33;

Guerra, C. C. Recherches sur le interactions anthocyanes-flavanols: application à l'interpretation chimique de la couleur des vins rouges. Thèse de Doctorat. Université Victor Segalen Bourdeaux 2, France, **1997**;

Hart, J. H. Role of Phytostilbenes in Decay and Disease Resistance. *Annual Review of Phytopathology* **1981**, 19, 437-458;

Haslam, E. Invino Veritas - Oligomeric Procyanidins and the Aging of Red Wines. *Phytochemistry* **1980**, 19, 2577-2582;

Haslam, E. Cambridge. Practical polyphenolics : from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge University Press. **2005**,

Haslam, E., Lilley, T. H. Natural Astringency in Foodstuffs - a Molecular Interpretation. *Crc Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **1988**, 27, 1-40;

Heredia, F. J., Francia-Aricha, E. M., Rivas-Gonzalo, J. C., Vicario, I. M., Santos-Buelga, C. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes - I. pH effect. *Food Chemistry* **1998**, 63, 491-498;

Hoshino, T., Matsumoto, U., Goto, T. Evidences of the Self-Association of Anthocyanins .1. Circular-Dichroism of Cyanin Anhydrobase. *Tetrahedron Letters* **1980**, 21, 1751-1754;

Hoshino, T., Matsumoto, U., Goto, T., Harada, N. Evidence for the Self-Association of Anthocyanins .4. Pmr Spectroscopic Evidence for the Vertical Stacking of Anthocyanin Molecules. *Tetrahedron Letters* **1982**, 23, 433-436;

IVDP (2004). "Vinhos do Porto." Retrieved 22-06-2016, 2016, from <http://www.ivdp.pt/>

Jeandet, P., Bessis, R., Gautheron, B. The Production of Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxystilbene) by Grape Berries in Different Developmental Stages. *American Journal of Enology and Viticulture* **1991**, 42, 41-46;

Jurd, L. Review of Polyphenol Condensation Reactions and Their Possible Occurrence in Aging of Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **1969**, 20, 191-195;

Korhammer, S., Reniero, F., Mattivi, F. An Oligostilbene from Vitis Roots. *Phytochemistry* **1995**, 38, 1501-1504;

Lagune, L., Glories, Y. Les nouvelles données concernant le collage des vins rouges avec les gèlatines oenologiques. *Rev. Fr. Oenol.* **1996a**, 80, 1820;

Langcake, P., Pryce, R. J. Oxidative Dimerization of 4-Hydroxystilbenes Invitro - Production of a Grapevine Phytoalexin Mimic. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* **1977**, 208-210;

Laranjinha, J., Cadenas, E. Redox cycles of caffeic acid, alpha-tocopherol, and ascorbate: Implications for protection of low-density lipoproteins against oxidation. *lubmb Life* **1999**, 48, 57-65;

Lea, A. G. H., Arnold, G. M. The phenolics of ciders: Bitterness and astringency. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1978**, 29, 478-483;

Lee, C. Y., Jaworski, A. Major Phenolic-Compounds in Ripening White Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* **1989**, 40, 43-46;

Lee, C. Y., Jaworski, A. W. Identification of Some Phenolics in White Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* **1990**, 41, 87-89;

Loureiro, V., Malfeito-Ferreira, M. Spoilage activities of *Dekkera/Brettanomyces* spp. Blackburn, C. (ed.). Food spoilage microorganisms. Chapter 13. Woodhead Publishers, Cambridge. **2006**, 354-398;

Mateus, N., de Freitas, V. Evolution and Stability of Anthocyanin-Derived Pigments during Port Wine Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, 49, 5217-5222;

Maury, C., Sarni-Manchado, P., Lefebvre, S., Cheynier, V., Moutounet, M. Influence of fining with different molecular weight gelatins on proanthocyanidin composition and perception of wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **2001**, 52, 140-145;

Michaud, J., Lacaze, P., Masquelier, J. Fractionnement des oligomeres flavanoliques du raisin. *Bull. Soc. Pham.* **1971**, 110, 111-116;

Michaud, J., Masqueli, J., Roudge, A. M. Synthesis of Natural Procyanidines. *Annales Pharmaceutiques Francaises* **1973**, 31, 385-395;

Moutounet, M., Rigaud, J., Souquet, J., Cheynier, V. Caractérisation struturelle des tanins de la baie de raisin. Quelques exemples de l'incidence du cépage, du terroir et du mode de conduite de la vigne. *Bull. de O.I.V.* **1996**, 734-784, 433-443;

Oberholster, A., Carstens, L. M., du Toit, W. J. Investigation of the effect of gelatine, egg albumin and cross-flow microfiltration on the phenolic composition of Pinotage wine. *Food Chemistry* **2013**, 138, 1275-1281;

Oliveira, J., Santos-Buelga, C., Silva, A. M. S., de Freitas, V., Mateus, N. Chromatic and structural features of blue anthocyanin-derived pigments present in Port wine. *Analytica Chimica Acta* **2006**, 563, 2-9;

Piretti, M. V., Ghedini, M., Serrazanetti, G. Isolation and Identification of Polyphenolic and Terpenoid Constituents of Vitis-Vinifera - V Trebbiano Variety. *Annali Di Chimica* **1976**, 66, 429-437;

Pissarra, J., Mateus, N., Rivas-Gonzalo, J., Buelga, C. S., de Freitas, V. Reaction between malvidin 3-glucoside and (+)-catechin in model solutions containing different aldehydes. *Journal of Food Science* **2003**, 68, 476-481;

Pocock, K. F., Salazar, F. N., Waters, E. J. The effect of bentonite fining at different stages of white winemaking on protein stability. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2011**, 17, 280-284;

Porter, L. (1988). Flavans and proanthocyanidins. The Flavonoids. J. B. Harborne, Springer US: 21-62.

Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Moutounet, M. Oligomeric and Polymeric Procyanidins from Grape Seeds. *Phytochemistry* **1994**, 36, 781-784;

Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P., Sudraud, P. *Traité d'oenologie*. Dunod **1977**, Paris

Ribéreau-Gayon, P. The anthocyanins of grape and wines. Anthocyanins as food colors. Ed. P. Markakis, *Academic Press*, New York. **1982**, 209-244;

Ribéreau-Gayon, P. Identification Desters Des Acides Cinnamiques Et De L'acide Tartique Dans Les Limbes Et Les Baies De V.Vinifera. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences* **1965**, 260-341;

Ribéreau-Gayon, P. Les composés phénoliques du raisin et du vin II. Les flavanosides et les anthocyanosides. *Ann. Physiol. Veg.* **1964**, 6, 211-242;

Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. Dosage des tannins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal.* **1966**, 2, 627-631;

Ricardo-Da-Silva, J. M., Belchior, A. P., Spranger, M. I., Bourzeix, M. Oligomeric Procyanidins of 3 Grapevine Varieties and Wines from Portugal. *Sciences Des Aliments* **1992a**, 12, 223-237;

Ricardo da Silva, J. M. Estrutura e composição das procianidinas da uva e do vinho: efeitos potenciais na saúde. *3º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo* **1995**, Vol. 2,

Ricardo da Silva, J. M., Cheynier, V., Souquet, J. M., Moutounet, M., Cabanis, J. C., Bourzeix, M. Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *J. Sci. Food Agric.* **1991c**, 57, 111-125;

Rivas-Gonzalo, J. C., Bravo-Haro, S., Santos-Buelga, C. Detection of Compounds Formed through the Reaction of Malvidin 3-Monoglucoside and Catechin in the Presence of Acetaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, 43, 1444-1449;

Salagoity-Auguste, M. H., Bertrand, A. Wine Phenolics - Analysis of Low-Molecular Weight Components by High-Performance Liquid-Chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1984**, 35, 1241-1247;

Santos-Buelga, C., Scalbert, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2000**, 80, 1094-1117;

Sarni-Manchado, P., Deleris, A., Avallone, S., Cheynier, V., Moutounet, M. Analysis and characterization of wine condensed tannins precipitated by proteins used as fining agent in enology. *American Journal of Enology and Viticulture* **1999**, 50, 81-86;

Singleton, V. L. Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems - Observations and Practical Implications. *American Journal of Enology and Viticulture* **1987**, 38, 69-77;

Singleton, V. L., Rossi, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **1965**, 16, 144-158;

Skury, A. L. D., Chagas, S., Bobrovnitchii, G. S., Monteiro, S. N. Use of Silicon Nitride as an additive in the production of cBN compacts for cutting tools. *Advanced Powder Technology VIII, Pts 1 and 2* **2012**, 727-728, 1040-1044;

Soleas, G. J., Diamandis, E. P., Goldberg, D. M. Wine as biological fluid: History, production and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **1997**, 11, 287-313;

Somers, T. C. Polymeric Nature of Wine Pigments. *Phytochemistry* **1971**, 10, 2175-2216;

Somers, T. C., Evans, M. E. Spectral evaluation of young red wines: Anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, "Chemical Age". *J. Sci. Food Agric.* **1976**, 28, 276-287;

Stankovic, S., Jovic, S., Zivkovic, J., Pavlovic, R. Influence Of Age On Red Wine Colour During Fining With Bentonite And Gelatin. *International Journal of Food Properties* **2012**, 15, 326-335;

Thompson, R. S., Jacques, D., Haslam, E. Plant Proanthocyanidins .1. Introduction - Isolation, Structure, and Distribution in Nature of Plant Procyanidins. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1972**, 1387-1399;

Timberlake, C. F., Bridle, P. Spectral Studies of Anthocyanin and Anthocyanidin Equilibria in Aqueous Solution. *Nature* **1966**, 212, 158-162;

Versari, A., Barbanti, D., Potentini, G., Mannazzu, I., Salvucci, A., Galassi, S. Physico-chemical characteristics of some oenological gelatins and their action on selected red wine components. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1998**, 78, 245-250;

Weinges, K., Kaltenha.W, Marx, H. D., Nader, E., Nader, F., Perner, J., Seiler, D. Knowledge of Proanthocyanidines .10. Procyanidines from Fruits. *Annalen Der Chemie-Justus Liebig* **1968**, 711, 184-204;

Zoecklein, B. W. The Chapman & Hall enology library. New York. Wine analysis and production. Chapman & Hall. **1995**,

Anexos

Tabela A - Intensidade Corante do Tawny e respectivas colagens

		420 nm	520 nm	620 nm	Intensidade Corante	IC*10	Média	Desvio Padrão
Controlo	1ª Leitura	0,177	0,209	0,041	0,427	4,269	4,26	0,01
	2ª Leitura	0,177	0,208	0,041	0,426	4,259		
	3ª Leitura	0,178	0,207	0,040	0,425	4,247		
Cola 1 + Bentonite A_1	1ª Leitura	0,140	0,173	0,030	0,342	3,422		
	2ª Leitura	0,142	0,171	0,029	0,342	3,419		
	3ª Leitura	0,142	0,171	0,029	0,342	3,416		
Cola 1 + Bentonite A_2	1ª Leitura	0,142	0,173	0,030	0,346	3,458		
	2ª Leitura	0,139	0,174	0,029	0,342	3,416		
	3ª Leitura	0,142	0,172	0,029	0,344	3,436		
Cola 1 + Bentonite A_3	1ª Leitura	0,141	0,175	0,031	0,347	3,470	3,44	0,03
	2ª Leitura	0,144	0,175	0,031	0,349	3,488		
	3ª Leitura	0,142	0,175	0,032	0,348	3,475		
Cola 2 + Bentonite A_1	1ª Leitura	0,148	0,180	0,034	0,361	3,614		
	2ª Leitura	0,148	0,181	0,033	0,362	3,623		
	3ª Leitura	0,148	0,181	0,034	0,363	3,634		
Cola 2 + Bentonite A_2	1ª Leitura	0,148	0,179	0,034	0,361	3,612		
	2ª Leitura	0,146	0,180	0,033	0,359	3,585		
	3ª Leitura	0,147	0,179	0,033	0,359	3,589		
Cola 2 + Bentonite A_3	1ª Leitura	0,150	0,183	0,037	0,369	3,689	3,64	0,04
	2ª Leitura	0,150	0,184	0,036	0,369	3,691		
	3ª Leitura	0,150	0,183	0,036	0,369	3,691		
Cola 3 + Bentonite A_1	1ª Leitura	0,154	0,184	0,034	0,371	3,711		
	2ª Leitura	0,153	0,182	0,033	0,368	3,678		
	3ª Leitura	0,153	0,183	0,032	0,369	3,687		
Cola 3 + Bentonite A_2	1ª Leitura	0,149	0,181	0,032	0,363	3,626		
	2ª Leitura	0,151	0,182	0,031	0,363	3,633		
	3ª Leitura	0,149	0,183	0,032	0,364	3,636		
Cola 3 + Bentonite A_3	1ª Leitura	0,149	0,183	0,032	0,364	3,641	3,65	0,03
	2ª Leitura	0,149	0,180	0,031	0,361	3,605		
	3ª Leitura	0,150	0,183	0,033	0,365	3,652		
Cola 4 + Bentonite A_1	1ª Leitura	0,142	0,176	0,032	0,350	3,499		
	2ª Leitura	0,142	0,173	0,031	0,346	3,458		
	3ª Leitura	0,143	0,174	0,031	0,348	3,482		
Cola 4 + Bentonite A_2	1ª Leitura	0,147	0,180	0,033	0,361	3,609		
	2ª Leitura	0,148	0,181	0,032	0,361	3,609		
	3ª Leitura	0,148	0,179	0,033	0,360	3,600		
Cola 4 + Bentonite A_3	1ª Leitura	0,144	0,177	0,035	0,356	3,556	3,55	0,06
	2ª Leitura	0,145	0,177	0,034	0,356	3,558		
	3ª Leitura	0,146	0,178	0,033	0,357	3,566		
Cola 4 + Bentonite B_1	1ª Leitura	0,141	0,174	0,032	0,346	3,462		
	2ª Leitura	0,142	0,173	0,031	0,345	3,452		
	3ª Leitura	0,142	0,174	0,031	0,346	3,460		
Cola 4 + Bentonite B_2	1ª Leitura	0,140	0,172	0,029	0,341	3,413		
	2ª Leitura	0,138	0,171	0,029	0,338	3,377		
	3ª Leitura	0,141	0,172	0,029	0,342	3,417		
Cola 4 + Bentonite B_3	1ª Leitura	0,142	0,173	0,033	0,348	3,476	3,45	0,04
	2ª Leitura	0,142	0,173	0,033	0,348	3,477		
	3ª Leitura	0,142	0,173	0,034	0,349	3,486		

Tabela B - Intensidade corante do Ruby e respectivas colagens

		420 nm	520 nm	620 nm	Intensidade Corante	IC*10	Média	Desvio Padrão
Controlo	1ª Leitura	0,383	0,641	0,132	1,155	11,552	11,55	0,004
	2ª Leitura	0,382	0,642	0,131	1,155	11,546		
	3ª Leitura	0,383	0,642	0,131	1,155	11,554		
Cola 1 + Bentonite A_1	1ª Leitura	0,329	0,536	0,116	0,981	9,806	10,11	0,252
	2ª Leitura	0,329	0,536	0,115	0,980	9,801		
	3ª Leitura	0,329	0,537	0,115	0,981	9,806		
Cola 1 + Bentonite A_2	1ª Leitura	0,336	0,564	0,115	1,015	10,148		
	2ª Leitura	0,336	0,563	0,115	1,013	10,134		
	3ª Leitura	0,336	0,564	0,115	1,014	10,144		
Cola 1 + Bentonite A_3	1ª Leitura	0,343	0,577	0,116	1,035	10,354		
	2ª Leitura	0,352	0,577	0,116	1,046	10,458		
	3ª Leitura	0,341	0,575	0,116	1,032	10,323		
Cola 2 + Bentonite A_1	1ª Leitura	0,348	0,588	0,118	1,054	10,536	10,55	0,028
	2ª Leitura	0,349	0,589	0,118	1,056	10,556		
	3ª Leitura	0,348	0,588	0,118	1,053	10,533		
Cola 2 + Bentonite A_2	1ª Leitura	0,347	0,587	0,117	1,051	10,511		
	2ª Leitura	0,348	0,587	0,117	1,052	10,517		
	3ª Leitura	0,349	0,587	0,117	1,053	10,527		
Cola 2 + Bentonite A_3	1ª Leitura	0,349	0,590	0,118	1,057	10,572		
	2ª Leitura	0,349	0,590	0,118	1,057	10,574		
	3ª Leitura	0,351	0,591	0,118	1,059	10,593		
Cola 3 + Bentonite A_1	1ª Leitura	0,356	0,606	0,121	1,083	10,825	10,85	0,022
	2ª Leitura	0,357	0,606	0,121	1,084	10,837		
	3ª Leitura	0,356	0,605	0,121	1,081	10,813		
Cola 3 + Bentonite A_2	1ª Leitura	0,359	0,607	0,122	1,089	10,887		
	2ª Leitura	0,357	0,605	0,122	1,084	10,841		
	3ª Leitura	0,357	0,605	0,121	1,084	10,838		
Cola 3 + Bentonite A_3	1ª Leitura	0,358	0,606	0,122	1,086	10,863		
	2ª Leitura	0,357	0,605	0,122	1,085	10,848		
	3ª Leitura	0,357	0,606	0,122	1,085	10,853		
Cola 4 + Bentonite A_1	1ª Leitura	0,350	0,590	0,119	1,059	10,585	10,61	0,026
	2ª Leitura	0,350	0,589	0,119	1,058	10,580		
	3ª Leitura	0,349	0,590	0,119	1,058	10,576		
Cola 4 + Bentonite A_2	1ª Leitura	0,349	0,593	0,120	1,062	10,624		
	2ª Leitura	0,350	0,594	0,120	1,065	10,645		
	3ª Leitura	0,351	0,593	0,120	1,064	10,636		
Cola 4 + Bentonite A_3	1ª Leitura	0,350	0,593	0,120	1,063	10,634		
	2ª Leitura	0,348	0,593	0,120	1,062	10,616		
	3ª Leitura	0,348	0,594	0,120	1,062	10,624		
Cola 4 + Bentonite B_1	1ª Leitura	0,349	0,588	0,117	1,054	10,544	10,46	0,089
	2ª Leitura	0,350	0,589	0,117	1,055	10,550		
	3ª Leitura	0,350	0,588	0,117	1,056	10,556		
Cola 4 + Bentonite B_2	1ª Leitura	0,344	0,578	0,115	1,037	10,366		
	2ª Leitura	0,342	0,576	0,115	1,033	10,330		
	3ª Leitura	0,344	0,578	0,114	1,035	10,354		
Cola 4 + Bentonite B_3	1ª Leitura	0,348	0,583	0,117	1,048	10,480		
	2ª Leitura	0,347	0,585	0,117	1,049	10,490		
	3ª Leitura	0,348	0,584	0,117	1,049	10,490		

Tabela C - Antocianinas Livres Totais do Tawny e respetivas colagens

Amostras		520 nm	Δ abs	[Vinho] (mg/L)	Média	Desvio Padrão
Controlo	Branco	0,1447			69,97	0,66
	1ª Leitura	0,0406	0,1041	69,24		
	2ª Leitura	0,0387	0,106	70,51		
	3ª Leitura	0,0392	0,1055	70,17		
Cola 1 + Bentonite A_1	Branco	0,1417			66,51	4,83
	1ª Leitura	0,0453	0,0964	64,11		
	2ª Leitura	0,0423	0,0994	66,11		
	3ª Leitura	0,0413	0,1004	66,77		
Cola 1 + Bentonite A_1	Branco	0,1383				
	1ª Leitura	0,0452	0,0931	61,91		
	2ª Leitura	0,0461	0,0922	61,31		
	3ª Leitura	0,0459	0,0924	61,44		
Cola 1 + Bentonite A_1	Branco	0,1498				
	1ª Leitura	0,0434	0,1064	70,77		
	2ª Leitura	0,0411	0,1087	72,31		
	3ª Leitura	0,0387	0,1111	73,91		
Cola 2 + Bentonite A_1	Branco	0,1431			72,85	1,68
	1ª Leitura	0,0371	0,106	70,51		
	2ª Leitura	0,0357	0,1074	71,44		
	3ª Leitura	0,0367	0,1064	70,77		
Cola 2 + Bentonite A_2	Branco	0,1459				
	1ª Leitura	0,0356	0,1103	73,37		
	2ª Leitura	0,037	0,1089	72,44		
	3ª Leitura	0,0359	0,11	73,17		
Cola 2 + Bentonite A_3	Branco	0,1453				
	1ª Leitura	0,0325	0,1128	75,04		
	2ª Leitura	0,0336	0,1117	74,31		
	3ª Leitura	0,0331	0,1122	74,64		
Cola 3 + Bentonite A_1	Branco	0,1391			72,27	3,20
	1ª Leitura	0,0377	0,1014	67,44		
	2ª Leitura	0,0353	0,1038	69,04		
	3ª Leitura	0,0371	0,102	67,84		
Cola 3 + Bentonite A_2	Branco	0,1481				
	1ª Leitura	0,0373	0,1108	73,71		
	2ª Leitura	0,035	0,1131	75,24		
	3ª Leitura	0,035	0,1131	75,24		
Cola 3 + Bentonite A_3	Branco	0,1471				
	1ª Leitura	0,036	0,1111	73,91		
	2ª Leitura	0,0359	0,1112	73,97		
	3ª Leitura	0,0358	0,1113	74,04		
Cola 4 + Bentonite A_1	Branco	0,1315			68,82	4,66
	1ª Leitura	0,0354	0,0961	63,91		
	2ª Leitura	0,0381	0,0934	62,11		
	3ª Leitura	0,0358	0,0957	63,64		
Cola 4 + Bentonite A_2	Branco	0,1439				
	1ª Leitura	0,0341	0,1098	73,04		
	2ª Leitura	0,0335	0,1104	73,44		
	3ª Leitura	0,0316	0,1123	74,71		
Cola 4 + Bentonite A_1	Branco	0,1378				
	1ª Leitura	0,0352	0,1026	68,24		
	2ª Leitura	0,0322	0,1056	70,24		
	3ª Leitura	0,0325	0,1053	70,04		
Cola 4 + Bentonite B_1	Branco	0,1372			68,14	1,82
	1ª Leitura	0,0313	0,1059	70,44		
	2ª Leitura	0,0328	0,1044	69,44		
	3ª Leitura	0,0322	0,105	69,84		
Cola 4 + Bentonite B_2	Branco	0,1294				
	1ª Leitura	0,031	0,0984	65,44		
	2ª Leitura	0,0305	0,0989	65,77		
	3ª Leitura	0,0293	0,1001	66,57		
Cola 4 + Bentonite B_3	Branco	0,134				
	1ª Leitura	0,0311	0,1029	68,44		
	2ª Leitura	0,0315	0,1025	68,17		
	3ª Leitura	0,03	0,104	69,17		

Tabela D - Antocianinas livres totais do Ruby e respectivas colagens

Amostras		520 nm	Δ abs	[Vinho] (mg/L)	Média	Desvio Padrão
Controlo	Branco	0,468			212,15	1,14
	1ª Leitura	0,1513	0,3167	210,97		
	2ª Leitura	0,1494	0,3186	212,24		
	3ª Leitura	0,1479	0,3201	213,24		
Cola 1 + Bentonite A_1	Branco	0,443			209,57	7,03
	1ª Leitura	0,1198	0,3232	215,31		
	2ª Leitura	0,1173	0,3257	216,97		
	3ª Leitura	0,1103	0,3327	221,64		
Cola 1 + Bentonite A_1	Branco	0,4373				
	1ª Leitura	0,1334	0,3039	202,44		
	2ª Leitura	0,1344	0,3029	201,77		
	3ª Leitura	0,1308	0,3065	204,17		
Cola 1 + Bentonite A_1	Branco	0,4365				
	1ª Leitura	0,1211	0,3154	210,11		
	2ª Leitura	0,1287	0,3078	205,04		
	3ª Leitura	0,1233	0,3132	208,64		
Cola 2 + Bentonite A_1	Branco	0,3765			170,20	1,58
	1ª Leitura	0,1247	0,2518	167,71		
	2ª Leitura	0,1192	0,2573	171,37		
	3ª Leitura	0,1231	0,2534	168,77		
Cola 2 + Bentonite A_2	Branco	0,3785				
	1ª Leitura	0,1239	0,2546	169,57		
	2ª Leitura	0,1249	0,2536	168,91		
	3ª Leitura	0,1231	0,2554	170,11		
Cola 2 + Bentonite A_3	Branco	0,3805				
	1ª Leitura	0,1226	0,2579	171,77		
	2ª Leitura	0,1234	0,2571	171,24		
	3ª Leitura	0,1217	0,2588	172,37		
Cola 3 + Bentonite A_1	Branco	0,3795			166,28	2,80
	1ª Leitura	0,1301	0,2494	166,11		
	2ª Leitura	0,1257	0,2538	169,04		
	3ª Leitura	0,1277	0,2518	167,71		
Cola 3 + Bentonite A_2	Branco	0,373				
	1ª Leitura	0,1282	0,2448	163,04		
	2ª Leitura	0,1288	0,2442	162,64		
	3ª Leitura	0,1289	0,2441	162,57		
Cola 3 + Bentonite A_3	Branco	0,3805				
	1ª Leitura	0,1289	0,2516	167,57		
	2ª Leitura	0,1274	0,2531	168,57		
	3ª Leitura	0,1264	0,2541	169,24		
Cola 4 + Bentonite A_1	Branco	0,378			179,45	9,33
	1ª Leitura	0,1249	0,2531	168,57		
	2ª Leitura	0,1267	0,2513	167,37		
	3ª Leitura	0,1268	0,2512	167,31		
Cola 4 + Bentonite A_2	Branco	0,399				
	1ª Leitura	0,1263	0,2727	181,64		
	2ª Leitura	0,1226	0,2764	184,11		
	3ª Leitura	0,1289	0,2701	179,91		
Cola 4 + Bentonite A_1	Branco	0,413				
	1ª Leitura	0,1304	0,2826	188,24		
	2ª Leitura	0,1297	0,2833	188,71		
	3ª Leitura	0,129	0,284	189,17		
Cola 4 + Bentonite B_1	Branco	0,411			187,15	5,83
	1ª Leitura	0,1282	0,2828	188,37		
	2ª Leitura	0,1292	0,2818	187,71		
	3ª Leitura	0,1279	0,2831	188,57		
Cola 4 + Bentonite B_2	Branco	0,417				
	1ª Leitura	0,1285	0,2885	192,17		
	2ª Leitura	0,1267	0,2903	193,37		
	3ª Leitura	0,1256	0,2914	194,11		
Cola 4 + Bentonite B_3	Branco	0,397				
	1ª Leitura	0,1249	0,2721	181,24		
	2ª Leitura	0,1266	0,2704	180,11		
	3ª Leitura	0,1287	0,2683	178,71		

Tabela E - Concentração de antocianinas monoglucósidas no Tawny e no Ruby

	[Tawny] (mg/L)	[Ruby] (mg/L)
Controlo_1	111,38	198,97
Controlo_2	106,14	195,33
Cola 1 + Bentonite A_1_1	101,63	184,78
Cola 1 + Bentonite A_1_2	100,70	182,45
Cola 1 + Bentonite A_2_1	98,50	189,18
Cola 1 + Bentonite A_2_2	100,35	193,78
Cola 1 + Bentonite A_3_1	103,98	197,57
Cola 1 + Bentonite A_3_2	99,98	192,83
Cola 2 + Bentonite A_1_1	101,39	194,67
Cola 2 + Bentonite A_1_2	101,66	196,96
Cola 2 + Bentonite A_2_1	99,93	188,06
Cola 2 + Bentonite A_2_2	99,45	190,06
Cola 2 + Bentonite A_3_1	94,48	185,44
Cola 2 + Bentonite A_3_2	94,14	187,33
Cola 3 + Bentonite A_1_1	99,79	184,19
Cola 3 + Bentonite A_1_2	101,83	188,76
Cola 3 + Bentonite A_2_1	100,61	206,10
Cola 3 + Bentonite A_2_2	100,85	207,26
Cola 3 + Bentonite A_3_1	99,46	78,13
Cola 3 + Bentonite A_3_2	102,29	111,38
Cola 4 + Bentonite A_1_1	105,78	114,87
Cola 4 + Bentonite A_1_2	104,77	113,85
Cola 4 + Bentonite A_2_1	102,82	189,39
Cola 4 + Bentonite A_2_2	100,88	191,10
Cola 4 + Bentonite A_3_1	102,70	195,90
Cola 4 + Bentonite A_3_2	100,41	198,20
Cola 4 + Bentonite B_1_1	98,33	194,18
Cola 4 + Bentonite B_1_2	98,56	194,62
Cola 4 + Bentonite B_2_1	97,69	201,81
Cola 4 + Bentonite B_2_2	97,64	204,39
Cola 4 + Bentonite B_3_1	69,32	210,62
Cola 4 + Bentonite B_3_2	63,77	213,72

$$[\text{Vinho}](\text{mg/L}) = (\text{Área}(520) + 612201) / 134709$$

Tabela F - Índice de Fenóis Totais do Tawny e respectivas colagens

	280 nm	IPT	Média	Desvio padrão
Controlo	0,22	22	22,93	0,83
	0,236	23,6		
	0,232	23,2		
Cola 1 + Bentonite A_1	0,2002	20,02	20,04	0,40
	0,1984	19,84		
	0,2007	20,07		
	0,1959	19,59		
	0,197	19,7		
	0,1958	19,58		
	0,2052	20,52		
	0,2042	20,42		
	0,2062	20,62		
Cola 2 + Bentonite A_1	0,2086	20,86	20,45	0,35
	0,2094	20,94		
	0,2072	20,72		
	0,2023	20,23		
	0,1994	19,94		
	0,2003	20,03		
	0,2044	20,44		
	0,205	20,5		
	0,2041	20,41		
Cola 3 + Bentonite A_1	0,2028	20,28	19,54	0,80
	0,2005	20,05		
	0,203	20,3		
	0,1991	19,91		
	0,1998	19,98		
	0,1983	19,83		
	0,1838	18,38		
	0,1859	18,59		
	0,1851	18,51		
Cola 4 + Bentonite A_1	0,1906	19,06	19,92	0,81
	0,1906	19,06		
	0,1904	19,04		
	0,2082	20,82		
	0,2099	20,99		
	0,2087	20,87		
	0,1977	19,77		
	0,2001	20,01		
	0,1965	19,65		
Cola 4 + Bentonite B_1	0,1982	19,82	19,77	0,08
	0,1978	19,78		
	0,1972	19,72		
	0,1981	19,81		
	0,1982	19,82		
	0,1992	19,92		
	0,1964	19,64		
	0,1971	19,71		
	0,1975	19,75		

Tabela G - Índice de Fenóis Totais no Ruby e respectivas colagens

	280 nm	IPT	Média	Desvio padrão
Controlo	0,4234	42,34	42,42	0,08
	0,4241	42,41		
	0,4250	42,50		
Cola 1 + Bentonite A_1	0,3852	38,52	38,44	0,14
	0,3855	38,55		
	0,3862	38,62		
	0,3837	38,37		
	0,3846	38,46		
	0,3855	38,55		
	0,3818	38,18		
	0,3834	38,34		
	0,3837	38,37		
Cola 2 + Bentonite A_1	0,3965	39,65	40,00	0,34
	0,3970	39,70		
	0,3970	39,70		
	0,3985	39,85		
	0,3992	39,92		
	0,3988	39,88		
	0,4040	40,40		
	0,4050	40,50		
	0,4041	40,41		
Cola 3 + Bentonite A_1	0,3969	39,69	40,00	0,18
	0,3987	39,87		
	0,3976	39,76		
	0,4009	40,09		
	0,4010	40,10		
	0,4020	40,20		
	0,4006	40,06		
	0,4004	40,04		
	0,4016	40,16		
Cola 4 + Bentonite A_1	0,3920	39,20	39,18	0,16
	0,3935	39,35		
	0,3930	39,30		
	0,3895	38,95		
	0,3899	38,99		
	0,3901	39,01		
	0,3928	39,28		
	0,3926	39,26		
	0,3930	39,30		
Cola 4 + Bentonite B_1	0,3885	38,85	38,81	0,08
	0,3877	38,77		
	0,3864	38,64		
	0,3879	38,79		
	0,3883	38,83		
	0,3892	38,92		
	0,3882	38,82		
	0,3880	38,80		
	0,3883	38,83		

Tabela H - Taninos Proantociânicos Totais do Tawny e respectivas colagens

		Abs 520 nm	Δ abs	[vinho] (g/L)	Média	Desvio Padrão
Controlo	Referência (branco)	0,0398			0,80	0,04
	1	0,0945	0,05	0,81		
	2	0,0926	0,05	0,77		
	3	0,0925	0,05	0,77		
	4	0,096	0,06	0,84		
Cola 1 + Bentonite A	Referência_1 (branco)	0,0402			0,60	0,04
	1	0,0842	0,04	0,57		
	2	0,0831	0,04	0,55		
	3	0,083	0,04	0,55		
	4	0,0845	0,04	0,58		
	Referência_2 (branco)	0,0244				
	1	0,0691	0,04	0,59		
	2	0,0726	0,05	0,67		
	3	0,0691	0,04	0,59		
	4	0,0723	0,05	0,66		
	Referência_3 (branco)	0,0254				
	1	0,0696	0,04	0,58		
	2	0,0712	0,05	0,61		
	3	0,0736	0,05	0,67		
	4	0,0722	0,05	0,64		
Cola 2 + Bentonite A	Referência_1 (branco)	0,0332			0,63	0,05
	1	0,0824	0,05	0,69		
	2	0,0824	0,05	0,69		
	3	0,0806	0,05	0,65		
	4	0,0824	0,05	0,69		
	Referência_2 (branco)	0,0296				
	1	0,0787	0,05	0,69		
	2	0,0774	0,05	0,66		
	3	0,0731	0,04	0,56		
	4	0,0746	0,05	0,60		
	Referência_3 (branco)	0,0388				
	1	0,0829	0,04	0,58		
	2	0,0844	0,05	0,61		
	3	0,0828	0,04	0,57		
	4	0,0853	0,05	0,63		
Cola 3 + Bentonite A	Referência_1 (branco)	0,0355			0,72	0,07
	1	0,0881	0,05	0,76		
	2	0,0895	0,05	0,79		
	3	0,0899	0,05	0,80		
	4	0,0917	0,06	0,84		
	Referência_2 (branco)	0,035				
	1	0,0837	0,05	0,68		
	2	0,0847	0,05	0,70		
	3	0,0844	0,05	0,69		
	4	0,0851	0,05	0,71		
	Referência_3 (branco)	0,0245				
	1	0,0729	0,05	0,67		
	2	0,0724	0,05	0,66		
	3	0,0731	0,05	0,68		
	4	0,0709	0,05	0,63		
Cola 4 + Bentonite A	Referência_1 (branco)	0,0354			0,62	0,07
	1	0,0789	0,04	0,56		
	2	0,0765	0,04	0,51		
	3	0,0792	0,04	0,57		
	4	0,0765	0,04	0,51		
	Referência_2 (branco)	0,0347				
	1	0,0808	0,05	0,62		
	2	0,0839	0,05	0,69		
	3	0,08	0,05	0,60		
	4	0,0832	0,05	0,67		
	Referência_3 (branco)	0,0373				
	1	0,0839	0,05	0,63		
	2	0,0827	0,05	0,61		
	3	0,0885	0,05	0,73		
	4	0,0861	0,05	0,68		
Cola 4 + Bentonite B	Referência_1 (branco)	0,0356			0,48	0,06
	1	0,0738	0,04	0,45		
	2	0,0719	0,04	0,41		
	3	0,0761	0,04	0,50		
	4	0,0764	0,04	0,50		
	Referência_2 (branco)	0,0292				
	1	0,0674	0,04	0,45		
	2	0,0675	0,04	0,45		
	3	0,0661	0,04	0,42		
	4	0,066	0,04	0,42		
	Referência_3 (branco)	0,033				
	1	0,078	0,05	0,60		
	2	0,074	0,04	0,51		
	3	0,0743	0,04	0,52		
	4	0,0748	0,04	0,53		

Tabela I - Taninos Proantociânicos Totais do Ruby e respectivas colagens.

		Abs 520 nm	Δabs	[vinho] (g/L)	Média	Desvio Padrão
Controlo	Referência (branco)	0,0821			1,83	0,04
	1	0,1838	0,10	1,84		
	2	0,1824	0,10	1,81		
	3	0,1816	0,10	1,79		
	4	0,1857	0,10	1,88		
Cola 1 + Bentonite A	Referência_1 (branco)	0,082			1,70	0,07
	1	0,182	0,10	1,80		
	2	0,1766	0,09	1,68		
	3	0,1801	0,10	1,76		
	4	0,1807	0,10	1,77		
	Referência_2 (branco)	0,0726				
	1	0,1636	0,09	1,61		
	2	0,1632	0,09	1,60		
	3	0,1676	0,10	1,69		
	4	0,172	0,10	1,79		
	Referência_3 (branco)	0,0732				
	1	0,1658	0,09	1,64		
	2	0,1652	0,09	1,63		
	3	0,1666	0,09	1,66		
	4	0,171	0,10	1,75		
Cola 2 + Bentonite A	Referência_1 (branco)	0,08			1,51	0,09
	1	0,168	0,09	1,54		
	2	0,1737	0,09	1,66		
	3	0,1706	0,09	1,60		
	4	0,1726	0,09	1,64		
	Referência_2 (branco)	0,0838				
	1	0,167	0,08	1,43		
	2	0,1684	0,08	1,46		
	3	0,1682	0,08	1,46		
	4	0,1641	0,08	1,37		
	Referência_3 (branco)	0,09				
	1	0,1735	0,08	1,44		
	2	0,1788	0,09	1,56		
	3	0,1772	0,09	1,52		
	4	0,1732	0,08	1,43		
Cola 3 + Bentonite A	Referência_1 (branco)	0,0964			1,34	0,39
	1	0,1844	0,09	1,54		
	2	0,1819	0,09	1,48		
	3	0,1815	0,09	1,48		
	4	0,1841	0,09	1,53		
	Referência_2 (branco)	0,0702				
	1	0,1277	0,06	0,87		
	2	0,1278	0,06	0,87		
	3	0,124	0,05	0,79		
	4	0,1239	0,05	0,79		
	Referência_3 (branco)	0,0836				
	1	0,1851	0,10	1,84		
	2	0,1747	0,09	1,61		
	3	0,1736	0,09	1,58		
	4	0,1777	0,09	1,67		
Cola 4 + Bentonite A	Referência_1 (branco)	0,0936			1,58	0,06
	1	0,1803	0,09	1,51		
	2	0,1872	0,09	1,66		
	3	0,1801	0,09	1,51		
	4	0,1861	0,09	1,64		
	Referência_2 (branco)	0,0905				
	1	0,176	0,09	1,48		
	2	0,1776	0,09	1,52		
	3	0,1821	0,09	1,62		
	4	0,1783	0,09	1,54		
	Referência_3 (branco)	0,0916				
	1	0,1806	0,09	1,56		
	2	0,1837	0,09	1,63		
	3	0,1824	0,09	1,60		
	4	0,1842	0,09	1,64		
Cola 4 + Bentonite B	Referência_1 (branco)	0,0931			1,43	0,07
	1	0,1792	0,09	1,50		
	2	0,1729	0,08	1,36		
	3	0,178	0,08	1,47		
	4	0,1783	0,09	1,48		
	Referência_2 (branco)	0,0871				
	1	0,1661	0,08	1,34		
	2	0,1659	0,08	1,34		
	3	0,1679	0,08	1,38		
	4	0,1653	0,08	1,32		
	Referência_3 (branco)	0,0883				
	1	0,1754	0,09	1,52		
	2	0,1713	0,08	1,43		
	3	0,1729	0,08	1,46		
	4	0,1752	0,09	1,52		

Tabela J- Índice de Diálise do Tawny e respetivas colagens.

Amostras		Sem Membrana	Com Membrana	I.D	I.D*10	Média	Desvio Padrão
Controlo	1ª Leitura	0,225	0,157	0,30	3,02	3,02	0,00
	2ª Leitura	0,225	0,157	0,30	3,02		
	3ª Leitura	0,225	0,157	0,30	3,02		
Cola 1 + Bentonite A_1	1ª Leitura	0,202	0,145	0,28	2,82	2,49	0,27
	2ª Leitura	0,202	0,145	0,28	2,82		
	3ª Leitura	0,202	0,145	0,28	2,82		
Cola 1 + Bentonite A_2	1ª Leitura	0,207	0,157	0,24	2,42		
	2ª Leitura	0,207	0,157	0,24	2,42		
	3ª Leitura	0,208	0,157	0,25	2,45		
Cola 1 + Bentonite A_3	1ª Leitura	0,206	0,16	0,22	2,23		
	2ª Leitura	0,205	0,16	0,22	2,20		
	3ª Leitura	0,205	0,16	0,22	2,20		
Cola 2 + Bentonite A_1	1ª Leitura	0,205	0,17	0,17	1,71	2,37	0,53
	2ª Leitura	0,205	0,17	0,17	1,71		
	3ª Leitura	0,205	0,17	0,17	1,71		
Cola 2 + Bentonite A_2	1ª Leitura	0,203	0,153	0,25	2,46		
	2ª Leitura	0,203	0,153	0,25	2,46		
	3ª Leitura	0,203	0,153	0,25	2,46		
Cola 2 + Bentonite A_3	1ª Leitura	0,215	0,152	0,29	2,93		
	2ª Leitura	0,215	0,152	0,29	2,93		
	3ª Leitura	0,215	0,152	0,29	2,93		
Cola 3 + Bentonite A_1	1ª Leitura	0,205	0,157	0,23	2,34	2,46	0,20
	2ª Leitura	0,205	0,157	0,23	2,34		
	3ª Leitura	0,205	0,157	0,23	2,34		
Cola 3 + Bentonite A_2	1ª Leitura	0,202	0,155	0,23	2,33		
	2ª Leitura	0,202	0,155	0,23	2,33		
	3ª Leitura	0,201	0,155	0,23	2,29		
Cola 3 + Bentonite A_3	1ª Leitura	0,194	0,141	0,27	2,73		
	2ª Leitura	0,194	0,141	0,27	2,73		
	3ª Leitura	0,194	0,141	0,27	2,73		
Cola 4 + Bentonite A_1	1ª Leitura	0,179	0,135	0,25	2,46	2,24	0,24
	2ª Leitura	0,179	0,135	0,25	2,46		
	3ª Leitura	0,179	0,135	0,25	2,46		
Cola 4 + Bentonite A_2	1ª Leitura	0,181	0,146	0,19	1,93		
	2ª Leitura	0,181	0,146	0,19	1,93		
	3ª Leitura	0,181	0,146	0,19	1,93		
Cola 4 + Bentonite A_3	1ª Leitura	0,176	0,135	0,23	2,33		
	2ª Leitura	0,176	0,135	0,23	2,33		
	3ª Leitura	0,176	0,135	0,23	2,33		
Cola 4 + Bentonite B_1	1ª Leitura	0,183	0,145	0,21	2,08	1,62	0,38
	2ª Leitura	0,183	0,144	0,21	2,13		
	3ª Leitura	0,182	0,144	0,21	2,09		
Cola 4 + Bentonite B_2	1ª Leitura	0,175	0,148	0,15	1,54		
	2ª Leitura	0,175	0,148	0,15	1,54		
	3ª Leitura	0,175	0,148	0,15	1,54		
Cola 4 + Bentonite B_3	1ª Leitura	0,169	0,149	0,12	1,18		
	2ª Leitura	0,169	0,148	0,12	1,24		
	3ª Leitura	0,169	0,148	0,12	1,24		

Tabela K - Índice de Diálise do Ruby e respetivas colagens

Amostras		Sem Membrana	Com Membrana	I.D	I.D*10	Média	Desvio Padrão
Controlo	1ª Leitura	0,387	0,249	0,36	3,57	3,56	0,01
	2ª Leitura	0,387	0,249	0,36	3,57		
	3ª Leitura	0,387	0,25	0,35	3,54		
Cola 1 + Bentonite A_1	1ª Leitura	0,202	0,145	0,28	2,82	2,65	0,18
	2ª Leitura	0,202	0,144	0,29	2,87		
	3ª Leitura	0,202	0,145	0,28	2,82		
Cola 1 + Bentonite A_2	1ª Leitura	0,207	0,157	0,24	2,42		
	2ª Leitura	0,207	0,157	0,24	2,42		
	3ª Leitura	0,208	0,156	0,25	2,50		
Cola 1 + Bentonite A_3	1ª Leitura	0,206	0,15	0,27	2,72		
	2ª Leitura	0,205	0,151	0,26	2,63		
	3ª Leitura	0,205	0,15	0,27	2,68		
Cola 2 + Bentonite A_1	1ª Leitura	0,359	0,249	0,31	3,06	3,00	0,15
	2ª Leitura	0,359	0,249	0,31	3,06		
	3ª Leitura	0,359	0,248	0,31	3,09		
Cola 2 + Bentonite A_2	1ª Leitura	0,364	0,25	0,31	3,13		
	2ª Leitura	0,364	0,25	0,31	3,13		
	3ª Leitura	0,363	0,25	0,31	3,11		
Cola 2 + Bentonite A_3	1ª Leitura	0,362	0,26	0,28	2,82		
	2ª Leitura	0,361	0,26	0,28	2,80		
	3ª Leitura	0,361	0,26	0,28	2,80		
Cola 3 + Bentonite A_1	1ª Leitura	0,363	0,233	0,36	3,58	3,53	0,39
	2ª Leitura	0,365	0,232	0,36	3,64		
	3ª Leitura	0,365	0,232	0,36	3,64		
Cola 3 + Bentonite A_2	1ª Leitura	0,366	0,254	0,31	3,06		
	2ª Leitura	0,365	0,254	0,30	3,04		
	3ª Leitura	0,365	0,254	0,30	3,04		
Cola 3 + Bentonite A_3	1ª Leitura	0,372	0,226	0,39	3,92		
	2ª Leitura	0,372	0,226	0,39	3,92		
	3ª Leitura	0,372	0,226	0,39	3,92		
Cola 4 + Bentonite A_1	1ª Leitura	0,364	0,249	0,32	3,16	3,30	0,10
	2ª Leitura	0,364	0,248	0,32	3,19		
	3ª Leitura	0,364	0,248	0,32	3,19		
Cola 4 + Bentonite A_2	1ª Leitura	0,378	0,249	0,34	3,41		
	2ª Leitura	0,378	0,249	0,34	3,41		
	3ª Leitura	0,378	0,249	0,34	3,41		
Cola 4 + Bentonite A_3	1ª Leitura	0,355	0,238	0,33	3,30		
	2ª Leitura	0,355	0,238	0,33	3,30		
	3ª Leitura	0,355	0,238	0,33	3,30		
Cola 4 + Bentonite B_1	1ª Leitura	0,362	0,245	0,32	3,23	3,39	0,15
	2ª Leitura	0,361	0,245	0,32	3,21		
	3ª Leitura	0,362	0,245	0,32	3,23		
Cola 4 + Bentonite B_2	1ª Leitura	0,36	0,239	0,34	3,36		
	2ª Leitura	0,36	0,239	0,34	3,36		
	3ª Leitura	0,36	0,239	0,34	3,36		
Cola 4 + Bentonite B_3	1ª Leitura	0,366	0,235	0,36	3,58		
	2ª Leitura	0,366	0,235	0,36	3,58		
	3ª Leitura	0,366	0,235	0,36	3,58		

Tabela L - Poder Tanante do Tawny e respetivas colagens

Amostras		Sem BSA (NTU)	Com BSA (NTU)	Turbidez (NTU/mL)	Média	Desvio Padrão
Controlo	1ª Leitura	0,56	8,04	93,5	93,94	0,73
	2ª Leitura	0,52	7,98	93,25		
	3ª Leitura	0,51	8,04	94,125		
	4ª Leitura	0,56	8,18	95,25		
	5ª Leitura	0,57	8,16	94,875		
Cola 1 + Bentonite A_1	1ª Leitura	0,46	5,45	62,375	78,03	1,84
	2ª Leitura	0,48	5,66	64,75		
	3ª Leitura	0,52	6,5	74,75		
	4ª Leitura	0,48	6,94	80,75		
	5ª Leitura	0,48	6,77	78,625		
Cola 1 + Bentonite A_2	1ª Leitura	0,44	6,59	76,875		
	2ª Leitura	0,42	6,43	75,125		
	3ª Leitura	0,59	6,36	72,125		
	4ª Leitura	0,45	6,36	73,875		
	5ª Leitura	0,44	6,75	78,875		
Cola 1 + Bentonite A_3	1ª Leitura	0,5	7,04	81,75		
	2ª Leitura	0,5	7,01	81,375		
	3ª Leitura	0,47	6,7	77,875		
	4ª Leitura	0,52	8,62	101,25		
	5ª Leitura	0,51	6,79	78,5		
Cola 2 + Bentonite A_1	1ª Leitura	0,63	7,48	85,625	85,91	1,14
	2ª Leitura	0,67	7,82	89,375		
	3ª Leitura	0,61	7,62	87,625		
	4ª Leitura	0,69	7,65	87		
	5ª Leitura	0,65	7,2	81,875		
Cola 2 + Bentonite A_2	1ª Leitura	0,59	7,44	85,625		
	2ª Leitura	0,61	7,33	84		
	3ª Leitura	0,6	7,19	82,375		
	4ª Leitura	0,69	7,08	79,875		
	5ª Leitura	0,61	7,91	91,25		
Cola 2 + Bentonite A_3	1ª Leitura	0,65	7,7	88,125		
	2ª Leitura	0,72	7,86	89,25		
	3ª Leitura	0,62	7,38	84,5		
	4ª Leitura	0,59	7,69	88,75		
	5ª Leitura	0,61	7,28	83,375		
Cola 3 + Bentonite A_1	1ª Leitura	0,81	8,04	90,375	88,35	2,83
	2ª Leitura	0,8	7,74	86,75		
	3ª Leitura	0,54	8,06	94		
	4ª Leitura	0,57	7,99	92,75		
	5ª Leitura	0,54	7,96	92,75		
Cola 3 + Bentonite A_2	1ª Leitura	0,64	7,43	84,875		
	2ª Leitura	0,56	7,44	86		
	3ª Leitura	0,59	7,71	89		
	4ª Leitura	0,56	7,55	87,375		
	5ª Leitura	0,51	7,94	92,875		
Cola 3 + Bentonite A_3	1ª Leitura	0,49	7,48	87,375		
	2ª Leitura	0,57	7,31	84,25		
	3ª Leitura	0,54	7,05	81,375		
	4ª Leitura	0,59	7,39	85		
	5ª Leitura	0,57	7,81	90,5		
Cola 4 + Bentonite A_1	1ª Leitura	0,69	6,4	71,375	81,69	3,60
	2ª Leitura	0,54	6,45	73,875		
	3ª Leitura	0,6	6,89	78,625		
	4ª Leitura	0,62	6,89	78,375		
	5ª Leitura	0,59	6,77	77,25		
Cola 4 + Bentonite A_2	1ª Leitura	0,52	6,94	80,25		
	2ª Leitura	0,53	7,01	81		
	3ª Leitura	0,5	7,04	81,75		
	4ª Leitura	0,49	7,23	84,25		
	5ª Leitura	0,53	7,23	83,75		
Cola 4 + Bentonite A_3	1ª Leitura	0,5	7,37	85,875		
	2ª Leitura	0,51	7,48	87,125		
	3ª Leitura	0,51	7,4	86,125		
	4ª Leitura	0,51	7,22	83,875		
	5ª Leitura	0,55	7,71	89,5		
Cola 4 + Bentonite B_1	1ª Leitura	0,5	7,23	84,125	82,01	2,26
	2ª Leitura	0,86	7,61	84,375		
	3ª Leitura	0,51	7,92	92,625		
	4ª Leitura	0,63	7,1	80,875		
	5ª Leitura	0,56	7,34	84,75		
Cola 4 + Bentonite B_2	1ª Leitura	0,62	6,46	73		
	2ª Leitura	0,52	6,97	80,625		
	3ª Leitura	0,55	6,81	78,25		
	4ª Leitura	0,77	6,97	77,5		
	5ª Leitura	0,5	7	81,25		
Cola 4 + Bentonite B_3	1ª Leitura	0,57	6,57	75		
	2ª Leitura	0,6	7,13	81,625		
	3ª Leitura	0,56	6,71	76,875		
	4ª Leitura	0,56	7,23	83,375		
	5ª Leitura	0,56	7,3	84,25		

Tabela M - Poder Tanante do Ruby e respectivas colagens.

Amostras		Sem BSA (NTU)	Com BSA (NTU)	Turbidez (NTU/mL)	Média	Desvio Padrão
Controlo	1ª Leitura	0,54	12,7	152	145,13	5,29
	2ª Leitura	0,6	12,1	143,75		
	3ª Leitura	0,56	10,6	125,5		
	4ª Leitura	0,56	12,2	145,5		
	5ª Leitura	0,56	11,7	139,25		
Cola 1 + Bentonite A. 1	1ª Leitura	0,51	11	131,125	137,92	2,91
	2ª Leitura	0,5	11,9	142,5		
	3ª Leitura	0,5	11,6	138,75		
	4ª Leitura	0,49	11,2	133,875		
	5ª Leitura	0,51	10,7	127,375		
Cola 1 + Bentonite A. 2	1ª Leitura	0,45	11,9	143,125		
	2ª Leitura	0,43	11,6	139,625		
	3ª Leitura	0,44	11,6	139,5		
	4ª Leitura	0,44	12,1	145,75		
	5ª Leitura	0,42	11,5	138,5		
Cola 1 + Bentonite A. 3	1ª Leitura	0,43	11,7	140,875		
	2ª Leitura	0,44	12	144,5		
	3ª Leitura	0,44	11,6	139,5		
	4ª Leitura	0,44	11,6	139,5		
	5ª Leitura	0,44	12,1	145,75		
Cola 2 + Bentonite A. 1	1ª Leitura	0,48	12	144	142,20	2,45
	2ª Leitura	0,42	12,1	146		
	3ª Leitura	0,42	11,8	142,25		
	4ª Leitura	0,43	11,7	140,875		
	5ª Leitura	0,4	12,1	146,25		
Cola 2 + Bentonite A. 2	1ª Leitura	0,5	11,5	137,5		
	2ª Leitura	0,49	12,5	150,125		
	3ª Leitura	0,45	12	144,375		
	4ª Leitura	0,43	11,4	137,125		
	5ª Leitura	0,42	12,8	154,75		
Cola 2 + Bentonite A. 3	1ª Leitura	0,51	12,5	149,875		
	2ª Leitura	0,43	12,7	153,375		
	3ª Leitura	0,45	11,4	136,875		
	4ª Leitura	0,45	12,1	145,625		
	5ª Leitura	0,43	12,1	145,875		
Cola 3 + Bentonite A. 1	1ª Leitura	0,47	12,5	150,375	141,68	1,67
	2ª Leitura	0,49	12,1	145,125		
	3ª Leitura	0,47	11,6	139,125		
	4ª Leitura	0,51	11,8	141,125		
	5ª Leitura	0,5	11,7	140		
Cola 3 + Bentonite A. 2	1ª Leitura	0,47	11,8	141,625		
	2ª Leitura	0,48	11,9	142,75		
	3ª Leitura	0,48	11,7	140,25		
	4ª Leitura	0,52	11,3	134,75		
	5ª Leitura	0,53	12,6	150,875		
Cola 3 + Bentonite A. 3	1ª Leitura	0,51	12,4	148,625		
	2ª Leitura	0,52	12,2	146		
	3ª Leitura	0,53	12,3	147,125		
	4ª Leitura	0,53	11,7	139,625		
	5ª Leitura	0,53	12,1	144,625		
Cola 4 + Bentonite A. 1	1ª Leitura	0,56	12,5	149,25	144,10	1,36
	2ª Leitura	0,52	11,9	142,25		
	3ª Leitura	0,48	12,1	145,25		
	4ª Leitura	0,57	12,3	146,625		
	5ª Leitura	0,53	12,3	147,125		
Cola 4 + Bentonite A. 2	1ª Leitura	0,46	12,8	154,25		
	2ª Leitura	0,47	13	156,625		
	3ª Leitura	0,46	12	144,25		
	4ª Leitura	0,53	12,2	145,875		
	5ª Leitura	0,5	11,5	137,5		
Cola 4 + Bentonite A. 3	1ª Leitura	0,47	12,2	146,625		
	2ª Leitura	0,45	12,6	151,875		
	3ª Leitura	0,47	12	144,125		
	4ª Leitura	0,47	11,9	142,875		
	5ª Leitura	0,47	12,2	146,625		
Cola 4 + Bentonite B. 1	1ª Leitura	0,47	12,3	147,875	143,08	0,97
	2ª Leitura	0,46	12	144,25		
	3ª Leitura	0,48	11,4	136,5		
	4ª Leitura	0,46	12,2	146,75		
	5ª Leitura	0,47	12,4	149,125		
Cola 4 + Bentonite B. 2	1ª Leitura	0,44	12,1	145,75		
	2ª Leitura	0,44	12,7	153,25		
	3ª Leitura	0,48	11,6	139		
	4ª Leitura	0,47	12,3	147,875		
	5ª Leitura	0,46	12,4	149,25		
Cola 4 + Bentonite B. 3	1ª Leitura	0,44	12,3	148,25		
	2ª Leitura	0,47	11,7	140,375		
	3ª Leitura	0,44	12,3	148,25		
	4ª Leitura	0,44	11,8	142		
	5ª Leitura	0,48	12,1	145,25		

Tabela N - Concentração de procianidinas no Tawny e no Ruby

Amostras	[Tawny] mg/L	Média	[Ruby] mg/L	Média
Controlo_I_1	1,1319	1,13	1,3442	1,34
Controlo_I_2	1,1223		1,3281	
Controlo_II_1	1,1557	1,15	1,3186	1,34
Controlo_II_2	1,1483		1,3516	
Cola 1 + Bentonite A 1 I 1	0,8952	0,93	0,8159	0,82
Cola 1 + Bentonite A 1 I 2	0,9122		0,8210	
Cola 1 + Bentonite A 1 II 1	0,9452		0,8217	
Cola 1 + Bentonite A 1 II 2	0,9797	0,94	0,8399	0,81
Cola 1 + Bentonite A 2 I 1	0,9893		0,8580	
Cola 1 + Bentonite A 2 I 2	0,9699		0,8898	
Cola 1 + Bentonite A 2 II 1	0,8936		0,7575	
Cola 1 + Bentonite A 2 II 2	0,9032	0,82	0,7535	0,94
Cola 1 + Bentonite A 3 I 1	0,8012		0,9146	
Cola 1 + Bentonite A 3 I 2	0,8380		0,9506	
Cola 1 + Bentonite A 3 II 1	0,8301		0,9399	
Cola 1 + Bentonite A 3 II 2	0,8296	0,81	0,9514	0,80
Cola 2 + Bentonite A 1 I 1	0,8562		0,7726	
Cola 2 + Bentonite A 1 I 2	0,8714		0,7375	
Cola 2 + Bentonite A 1 II 1	0,7459		0,8193	
Cola 2 + Bentonite A 1 II 2	0,7687	0,51	0,8755	0,89
Cola 2 + Bentonite A 2 I 1	0,5176		0,9122	
Cola 2 + Bentonite A 2 I 2	0,5178		0,9442	
Cola 2 + Bentonite A 2 II 1	0,4987		0,8648	
Cola 2 + Bentonite A 2 II 2	0,5007	0,76	0,8521	0,90
Cola 2 + Bentonite A 3 I 1	0,6080		0,8756	
Cola 2 + Bentonite A 3 I 2	0,6109		0,8755	
Cola 2 + Bentonite A 3 II 1	0,8968		0,9264	
Cola 2 + Bentonite A 3 II 2	0,9170	0,79	0,9360	0,88
Cola 3 + Bentonite A 1 I 1	0,6920		0,9034	
Cola 3 + Bentonite A 1 I 2	0,6846		0,9208	
Cola 3 + Bentonite A 1 II 1	0,8853		0,8391	
Cola 3 + Bentonite A 1 II 2	0,8937	0,84	0,8521	0,81
Cola 3 + Bentonite A 2 I 1	0,8049		0,7107	
Cola 3 + Bentonite A 2 I 2	0,8263		0,7026	
Cola 3 + Bentonite A 2 II 1	0,8713		0,9001	
Cola 3 + Bentonite A 2 II 2	0,8468	0,85	0,9226	0,85
Cola 3 + Bentonite A 3 I 1	0,8187		0,8088	
Cola 3 + Bentonite A 3 I 2	0,8554		0,8010	
Cola 3 + Bentonite A 3 II 1	0,8613		0,8922	
Cola 3 + Bentonite A 3 II 2	0,8705	0,87	0,9144	1,02
Cola 4 + Bentonite A 1 I 1	0,8615		1,0078	
Cola 4 + Bentonite A 1 I 2	0,8967		1,0209	
Cola 4 + Bentonite A 1 II 1	0,8571		1,0185	
Cola 4 + Bentonite A 1 II 2	0,8738	0,84	1,0162	0,94
Cola 4 + Bentonite A 2 I 1	0,8183		0,8661	
Cola 4 + Bentonite A 2 I 2	0,8412		0,8686	
Cola 4 + Bentonite A 2 II 1	0,8435		1,0230	
Cola 4 + Bentonite A 2 II 2	0,8500	0,82	1,0210	0,84
Cola 4 + Bentonite A 3 I 1	0,8418		0,7948	
Cola 4 + Bentonite A 3 I 2	0,8819		0,7849	
Cola 4 + Bentonite A 3 II 1	0,7747		0,8909	
Cola 4 + Bentonite A 3 II 2	0,7927	0,83	0,8974	0,99
Cola 4 + Bentonite B 1 I 1	0,8218		0,9356	
Cola 4 + Bentonite B 1 I 2	0,8266		0,9497	
Cola 4 + Bentonite B 1 II 1	0,8200		1,0533	
Cola 4 + Bentonite B 1 II 2	0,8492	0,75	1,0327	1,04
Cola 4 + Bentonite B 2 I 1	0,8058		1,0684	
Cola 4 + Bentonite B 2 I 2	0,8227		1,0091	
Cola 4 + Bentonite B 2 II 1	0,6709		1,0376	
Cola 4 + Bentonite B 2 II 2	0,6930	0,93	1,0392	1,03
Cola 4 + Bentonite B 3 I 1	0,9635		1,0077	
Cola 4 + Bentonite B 3 I 2	0,9846		0,9986	
Cola 4 + Bentonite B 3 II 1	0,8807		1,0590	
Cola 4 + Bentonite B 3 II 2	0,8925		1,0739	

[Vinho] (mg/L) = Área (280) - 70494/43508731

Tabela O - Índice de Folin-Ciocalteu do Tawny e respectivas colagens

	Branco	Controlo	Cola 1 + Bentonite A			Cola 2 + Bentonite A			Cola 3 + Bentonite A			Cola 4 + Bentonite A			Cola 4 + Bentonite B		
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
A	0,048	0,343	0,319	0,36	0,36	0,354	0,356	0,348	0,37	0,341	0,359	0,345	0,341	0,345	0,344	0,343	0,423
B	0,052	0,372	0,342	0,359	0,35	0,33	0,35	0,363	0,447	0,346	0,352	0,383	0,294	0,353	0,382	0,337	0,36
C	0,05	0,367	0,345	0,35	0,349	0,356	0,368	0,373	0,369	0,342	0,339	0,36	0,32	0,402	0,366	0,322	0,344
Δ Abs		0,295	0,271	0,312	0,312	0,306	0,308	0,3	0,322	0,293	0,311	0,297	0,293	0,297	0,296	0,295	0,375
		0,32	0,29	0,307	0,298	0,278	0,298	0,311	0,395	0,294	0,3	0,331	0,242	0,301	0,33	0,285	0,308
		0,317	0,295	0,3	0,299	0,306	0,318	0,323	0,319	0,292	0,289	0,31	0,27	0,352	0,316	0,272	0,294
Δ Abs corrigida		0,312	0,287	0,330	0,330	0,324	0,326	0,317	0,341	0,310	0,329	0,314	0,310	0,314	0,313	0,312	0,397
		0,339	0,307	0,325	0,315	0,294	0,315	0,329	0,418	0,311	0,317	0,350	0,256	0,319	0,349	0,302	0,326
		0,335	0,312	0,317	0,316	0,324	0,337	0,342	0,338	0,309	0,306	0,328	0,286	0,372	0,334	0,288	0,311
mg/mL Ácido gálico		0,324	0,298	0,343	0,343	0,336	0,338	0,329	0,354	0,322	0,342	0,326	0,322	0,326	0,325	0,324	0,412
		0,351	0,319	0,337	0,327	0,305	0,327	0,342	0,434	0,323	0,329	0,364	0,266	0,331	0,362	0,313	0,338
		0,348	0,324	0,329	0,328	0,336	0,349	0,355	0,350	0,321	0,317	0,340	0,297	0,387	0,347	0,299	0,323
Média		0,341	0,313	0,336	0,333	0,326	0,338	0,342	0,352	0,322	0,329	0,343	0,295	0,348	0,345	0,312	0,331
Desvio Padrão		0,015	0,014	0,007	0,009	0,018	0,011	0,013	0,002	0,001	0,012	0,019	0,028	0,034	0,019	0,013	0,011
Média		0,34	0,33			0,34			0,33			0,33			0,33		
Desvio Padrão		0,01	0,01			0,01			0,02			0,03			0,02		

Tabela P - Índice de Folin-Ciocalteu do Ruby e respectivas colagens

	Branco	Controlo	Cola 1 + Bentonite A			Cola 2 + Bentonite A			Cola 3 + Bentonite A			Cola 4 + Bentonite A			Cola 4 + Bentonite B		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5
A	0,048	0,087	0,082	0,079	0,084	0,084	0,085	0,088	0,085	0,084	0,084	0,088	0,083	0,086	0,083	0,084	0,084
B	0,047	0,09	0,085	0,085	0,086	0,086	0,085	0,09	0,084	0,085	0,086	0,102	0,086	0,085	0,083	0,085	0,085
C	0,049	0,089	0,081	0,083	0,084	0,085	0,086	0,042	0,086	0,086	0,085	0,084	0,086	0,085	0,084	0,086	0,086
D	0,049	0,087	0,083	0,087	0,084	0,083	0,085	0,084	0,087	0,086	0,086	0,084	0,087	0,086	0,084	0,086	0,086
Δ Abs		0,039	0,034	0,031	0,036	0,036	0,037	0,04	0,037	0,036	0,036	0,04	0,035	0,038	0,035	0,036	0,036
		0,043	0,038	0,038	0,039	0,039	0,038	0,043	0,037	0,038	0,039	0,055	0,039	0,038	0,036	0,038	0,038
		0,04	0,032	0,034	0,035	0,036	0,037	-0,007	0,037	0,037	0,036	0,035	0,037	0,036	0,035	0,037	0,037
		0,038	0,034	0,038	0,035	0,034	0,036	0,035	0,038	0,037	0,037	0,035	0,038	0,037	0,035	0,037	0,037
Δ Abs corrigida		0,041	0,036	0,033	0,038	0,038	0,039	0,042	0,039	0,038	0,038	0,042	0,037	0,040	0,037	0,038	0,038
		0,046	0,040	0,040	0,041	0,041	0,040	0,046	0,039	0,040	0,041	0,058	0,041	0,040	0,038	0,040	0,040
		0,042	0,034	0,036	0,037	0,038	0,039	-0,007	0,039	0,039	0,038	0,037	0,039	0,038	0,037	0,039	0,039
		0,040	0,036	0,040	0,037	0,036	0,038	0,037	0,040	0,039	0,039	0,037	0,040	0,039	0,037	0,039	0,039
mg/mL Ácido gálico		0,043	0,037	0,034	0,040	0,040	0,041	0,044	0,041	0,040	0,040	0,044	0,039	0,042	0,039	0,040	0,040
		0,047	0,042	0,042	0,043	0,043	0,042	0,047	0,041	0,042	0,043	0,060	0,043	0,042	0,040	0,042	0,042
		0,044	0,035	0,037	0,039	0,040	0,041	-0,008	0,041	0,041	0,040	0,039	0,041	0,040	0,039	0,041	0,041
		0,042	0,037	0,042	0,039	0,037	0,040	0,039	0,042	0,041	0,041	0,039	0,042	0,041	0,039	0,041	0,041
Factor de diluição (20x)		0,858	0,749	0,683	0,793	0,793	0,815	0,880	0,815	0,793	0,793	0,880	0,771	0,837	0,771	0,793	0,793
		0,946	0,837	0,837	0,858	0,858	0,837	0,946	0,815	0,837	0,858	1,210	0,858	0,837	0,793	0,837	0,837
		0,880	0,705	0,749	0,771	0,793	0,815	-0,152	0,815	0,815	0,793	0,771	0,815	0,793	0,771	0,815	0,815
		0,837	0,749	0,837	0,771	0,749	0,793	0,771	0,837	0,815	0,815	0,771	0,837	0,815	0,771	0,815	0,815
Média		0,858	0,734	0,716	0,778	0,778	0,807	0,826	0,815	0,807	0,800	0,807	0,837	0,820	0,776	0,807	0,807
Desvio Padrão		0,022	0,025	0,047	0,013	0,025	0,018	0,089	0,000	0,013	0,013	0,063	0,022	0,021	0,011	0,013	0,013
Média		0,858	0,743			0,804			0,807			0,821			0,797		
Desvio Padrão		0,022	0,032			0,024			0,007			0,015			0,018		

Tabela R - Capacidade antiradicalar do Ruby e respectivas colagens

			Controlo	Cola 1 + Bentonite A				Cola 2 + Bentonite A			Cola 3 + Bentonite A			Cola 4 + Bentonite A			Cola 4 + Bentonite B		
% actividade anti			39,26	29,43	45,73	33,41	20,20	45,54	23,25	42,23	41,41	36,93	30,65	32,53	33,07	37,69	27,97	28,21	
			27,31	28,95	22,30	32,33	37,16	34,46	43,84	31,62	30,08	32,18	45,10	35,75	26,84	24,62	34,74	30,67	
			21,23	30,25	35,68	32,46	19,04	34,20	35,92	31,48	32,53	29,09	28,61	43,38	37,96	27,89	24,82	34,69	
			27,34	39,73	32,04	30,30	34,80	30,48	26,91	31,75	35,03	29,02	46,10	39,66	33,25	29,02	25,30	28,46	
µM equivalentes de trolox			20,47	17,41	22,48	18,65	14,54	22,42	15,49	21,39	21,13	19,74	17,79	18,37	18,54	19,98	16,96	17,03	
			16,75	17,26	15,19	18,31	19,81	18,97	21,89	18,09	17,61	18,26	22,28	19,37	16,61	15,92	19,06	17,80	
			14,86	17,66	19,35	18,35	14,18	18,89	19,43	18,05	18,37	17,30	17,16	21,75	20,06	16,93	15,98	19,04	
			16,76	20,61	18,22	17,68	19,08	17,74	16,63	18,13	19,15	17,28	22,59	20,59	18,60	17,28	16,13	17,11	
Factor de diluição (20x)			409,31	348,17	449,53	372,95	290,81	448,35	309,78	427,80	422,66	394,83	355,75	367,45	370,82	399,57	339,14	340,63	
			335,04	345,24	303,88	366,20	396,28	379,49	437,81	361,81	352,21	365,27	445,64	387,50	332,11	318,32	381,21	355,93	
			297,19	353,30	387,04	367,03	283,58	377,87	388,55	360,95	367,49	346,06	343,10	434,93	401,22	338,66	319,55	380,89	
			335,23	412,21	364,43	353,58	381,61	354,75	332,55	362,60	382,99	345,68	451,86	411,83	371,95	345,62	322,55	342,17	
Média			322,49	348,90	375,74	364,94	388,95	370,71	360,55	361,79	367,57	362,96	349,43	377,48	358,30	342,14	327,08	346,24	
Desvio Padrão			21,91	4,08	15,98	8,15	10,37	13,84	39,60	0,82	15,39	23,13	8,95	14,17	22,68	4,93	10,55	8,43	
Média			322,49	363,19			373,40			364,11			361,73			338,49			
Desvio Padrão			21,91	13,50			14,39			3,05			14,34			10,09			

Tabela S - Avaliação do poder redutor do Tawny e respetivas colagens

				Controlo	Cola 1 + Bentonite A	Cola 2 + Bentonite A	Cola 3 + Bentonite A	Cola 4 + Bentonite A	Cola 4 + Bentonite B										
variação da Abs				0,382	0,359	0,406	0,39	0,386	0,391	0,384	0,374	0,377	0,387	0,384	0,394	0,378	0,41	0,42	0,42
				0,374	0,348	0,41	0,387	0,388	0,38	0,38	0,388	0,345	0,39	0,391	0,403	0,386	0,422	0,415	0,398
				0,393	0,375	0,395	0,382	0,399	0,376	0,385	0,387	0,384	0,388	0,407	0,407	0,406	0,418	0,402	0,419
				0,379	0,364	0,39	0,373	0,401	0,381	0,378	0,409	0,373	0,384	0,401	0,4	0,396	0,412	0,421	0,42
µM equivalentes de Trolox				10,63	10,10	11,19	10,82	10,73	10,84	10,68	10,45	10,52	10,75	10,68	10,91	10,54	11,29	11,52	11,52
				10,45	9,84	11,29	10,75	10,77	10,59	10,59	10,77	9,77	10,82	10,84	11,12	10,73	11,57	11,40	11,01
				10,89	10,47	10,94	10,63	11,03	10,49	10,70	10,75	10,68	10,77	11,22	11,22	11,19	11,47	11,10	11,50
				10,56	10,21	10,82	10,42	11,08	10,61	10,54	11,26	10,42	10,68	11,08	11,05	10,96	11,33	11,54	11,52
Factor de diluição 10 vezes				106,34	100,98	111,93	108,21	107,27	108,44	106,81	104,48	105,17	107,51	106,81	109,14	105,41	112,87	115,20	115,20
				104,48	98,41	112,87	107,51	107,74	105,87	105,87	107,74	97,72	108,21	108,44	111,24	107,27	115,66	114,03	110,07
				108,90	104,71	109,37	106,34	110,30	104,94	107,04	107,51	106,81	107,74	112,17	112,17	111,93	114,73	111,00	114,97
				105,64	102,14	108,21	104,24	110,77	106,11	105,41	112,63	104,24	106,81	110,77	110,54	109,60	113,33	115,43	115,20
Média				106,96	100,51	109,84	106,03	107,51	105,64	106,03	106,57	105,41	107,56	108,67	110,30	107,43	113,64	114,89	115,12
Desvio Padrão				1,72	1,91	1,91	1,65	0,33	0,62	0,71	1,82	1,30	0,58	2,39	1,28	2,83	0,97	2,04	0,13
Média				106,96	105,46			106,39			106,52			108,80			114,55		
Desvio Padrão				1,72	4,69			0,98			1,08			1,44			0,79		

Tabela T- Avaliação do poder redutor no Ruby e respectivas colagens

				Controlo	Cola 1 + Bentonite A			Cola 2 + Bentonite A			Cola 3 + Bentonite A			Cola 4 + Bentonite A			Cola 4 + Bentonite B		
variação da Abs				0,562	0,45	0,49	0,521	0,479	0,546	0,53	0,492	0,507	0,548	0,507	0,469	0,497	0,547	0,529	0,549
				0,543	0,454	0,466	0,491	0,446	0,545	0,546	0,51	0,512	0,527	0,456	0,49	0,487	0,505	0,545	0,559
				0,583	0,455	0,519	0,51	0,483	0,533	0,553	0,514	0,495	0,539	0,481	0,492	0,5	0,536	0,55	0,559
µM equivalentes de Trolox				14,83	12,22	13,15	13,87	12,90	14,46	14,08	13,20	13,55	14,50	13,55	12,66	13,31	14,48	14,06	14,53
				14,39	12,31	12,59	13,17	12,13	14,43	14,46	13,62	13,66	14,01	12,36	13,15	13,08	13,50	14,43	14,76
				15,32	12,34	13,83	13,62	12,99	14,15	14,62	13,71	13,27	14,29	12,94	13,20	13,38	14,22	14,55	14,76
Factor de diluição 20 vezes				296,60	244,38	263,03	277,48	257,90	289,14	281,68	263,96	270,96	290,07	270,96	253,24	266,29	289,60	281,21	290,54
				287,74	246,25	251,84	263,50	242,52	288,67	289,14	272,35	273,29	280,28	247,18	263,03	261,63	270,02	288,67	295,20
				306,39	246,71	276,55	272,35	259,77	283,08	292,40	274,22	265,36	285,87	258,83	263,96	267,69	284,48	291,00	295,20
Média				296,91	245,78	257,44	274,92	258,83	286,96	287,74	273,29	272,12	283,08	264,90	263,50	265,21	287,04	289,84	293,64
Desvio Padrão				9,33	1,23	7,91	3,63	9,47	3,37	5,50	1,32	1,65	3,96	8,57	0,66	3,17	3,63	1,65	2,69
Média				296,91	251,61			287,35			276,16			264,53			290,17		
Desvio Padrão				9,33	8,24			0,55			6,02			0,91			3,32		